



**SAVONIA**

■ OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO  
LUONNONVARA- JA YMPÄRISTÖALA

# NAUDAN ALKIOHUUHTELUN KEHITTÄMINEN

Superovulaatiokäsittely ja tuorealkioiden viileäkuljetus

TEKIJÄ: Sara Kukkonen

Koulutusala Luonnonvara- ja ympäristöala			
Koulutusohjelma Maaseutuelinkeinojen koulutusohjelma			
Työn tekijä Sara Kukkonen			
Työn nimi Naudan alkiohuuhtelun kehittäminen – superovulaatiokäsittely ja tuorealkioiden viileäkuljetus			
Päiväys	4.5.2017	Sivumäärä/Liitteet	57/3
Ohjaajat Heli Wahlroos ja Pirjo Suhonen			
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani Heli Lindeberg/Luonnonvarakeskus			
<p>Tiivistelmä</p> <p>Opinnäytetyössä raportoidun tutkimuksen tavoitteena oli kehittää naudan alkiohuuhtelun superovulaatiokäsittelyohjelmaa ja tuorealkioiden viileäkuljetusta. Tutkimuksessa selvitettiin, poikkeako nykyisin käytössä olevan kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelman ja uuden kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelman kyky tuottaa siirtokelpoisia alkioita toisistaan. Tutkimus toteutettiin Luonnonvarakeskuksen Maaningan toimipisteen tutkimuspihatossa (Cowlab™) ja alkioiden viileäkuljetuksen osalta yhteistyössä Luonnonvarakeskuksen Jokioisten toimipisteen ja Viking Geneticsin kanssa.</p> <p>Tutkimukseen valittiin 12 lypsylehmää. Lehmille toteutettiin kumpikin superovulaatiokäsittely arvotussa järjestyksessä ja alkiohuuhtelut, joiden jälkeen alkiosaanto laskettiin. Siirtokelpoisten alkioiden kehitysaste ja laatu arvioitiin. Surkastuneet alkioita ja hedelmöittymättömät munasolut hävitettiin. Siirtokelpoiset tuorealkiot pakattiin olkiin ja lähetettiin viileäkuljetuksessa Luonnonvarakeskuksen Jokioisten toimipisteeseen, jossa tarkasteltiin, kuinka pitkän viileäsäilytyksen (1,3,5 tai 7 vrk) tuorealkiot kestivät. Tämä arvioitiin jatkotasvattamalla alkioita kasvatuskaapissa viileässä säilyttämisen jälkeen ja tarkastamalla alkioiden kunto 24, 48 ja 72 tuntia jatkotasvatuksen aloittamisesta.</p> <p>Tutkittujen superovulaatiokäsittelyohjelmien alkiontuottokyky ei poikennut tilastollisesti merkitsevästi toisistaan (<math>p=0,47</math>). Kokeeseen valituista lehmistä kahdeksan alkiohuuhdeltiin onnistuneesti molemmilla alkiohuuhtelukierroksilla. Nämä lehmät tuottivat kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla keskimäärin <math>12,50 \pm 7,11</math> (keskiarvo <math>\pm</math> keskihajonta) ja kahden pistoksen käsittelyohjelmalla keskimäärin <math>10,13 \pm 4,67</math> siirtokelpoista alkioita alkiohuuhtelua kohti. Parhaiten tuorealkiot kestivät yhden ja kolmen vuorokauden viileäsäilytyksen. Yhden vuorokauden ajan viileäsäilytetyistä tuorealkioista keskimäärin 71,2 % säilytti edelleenkehittymiskykynsä viileäsäilytyksen jälkeisessä jatkotasvatuksessa kuoriutumalla munasolun keton sisältä.</p> <p>Tutkimuksen tulos on kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelman kannalta lupaava. Tulosta voivat hyödyntää toimeksiantajan ja yhteistyökumppanien lisäksi nautatilalliset. Tulevaisuudessa uuden superovulaatiokäsittelyohjelman tutkimusta tulisi jatkaa suuremmalla otoskoolla, aloittamalla kahden pistoksen käsittelyohjelma lehmän luonnollisesta kiimasta ja seuraamalla käsittelyjen lehmien kiimakierron toimintaa pidempään alkiohuuhteluiden jälkeen, jolloin kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelman aiheuttamat mahdolliset häiriöt kiimakierron toiminnassa voitaisiin selvittää.</p>			
Avainsanat nauta, alkionsiirto, alkiohuuhtelu, superovulaatio, tuorealkioiden viileäkuljetus			

Field of Study Natural Resources and the Environment			
Degree Programme Degree Program in Agriculture and Rural Development			
Author Sara Kukkonen			
Title of Thesis Development of embryo flushing in cattle – superovulation and cool-transportation of fresh embryos			
Date	4.5.2017	Pages/Appendices	57/3
Supervisors Heli Wahlroos ja Pirjo Suhonen			
Client Organisation /Partners Heli Lindeberg/Luonnonvarakeskus/Luke Natural Resources Institute Finland			
<p>Abstract</p> <p>The aim of the research reported in this thesis is to improve the superovulatory treatment of the donor cow and the cool-transportation of the fresh embryos. In the research, the aim was to study if two different superovulatory treatments differ from each other in the number of produced transferable embryos. The research was made in the cowbarn (Cowlab™) of the Natural Resources Institute Finland (Luke) in Maaninka agency. The partners in cooperation of the cool-transportation of the fresh embryos were Luke Jokioinen agency and Viking Genetics.</p> <p>Twelve dairy cows were chosen to the research. Both superovulatory treatments were initiated in random order to the cows and after embryo flushings the number of transferable embryos was counted. Degenerated embryos and unfertilized ova were discarded. Transferable embryos were graded into excellent, good and fair categories according to their stage of development and quality grade. All transferable fresh embryos were packed in straws and cool-transported to Luke Jokioinen agency to be inspected how long time (1, 3, 5 or 7 days) the fresh embryos survive the cool-storage. This was studied by culturing the cool-stored embryos in an incubator and monitoring their viability under microscope after 24, 48 and 72 hours in culture.</p> <p>The number of transferable embryos did not significantly vary between superovulatory treatments (<math>p=0,47</math>). From the selected 12 cows, eight were flushed successfully both times. The eight cows which were flushed using the widely used superovulatory treatment gave on average of <math>12,50 \pm 7,11</math> (<math>\pm</math>SD) transferable embryos while using the new superovulatory treatment resulted in an average of <math>10,13 \pm 4,67</math> (<math>\pm</math>SD) transferable embryos. In the cool-transportation, embryos cool-stored for one or three days had the best survival rate after culture. After culture of one day cool-stored embryos, an average of 71,2 % of the cultured embryos retained their viability by hatching from the zona pellucida.</p> <p>The result is in favor for the new superovulatory treatment. The result can be used by the ordering party, the partners in cooperation and cattle farmers. In the future, the new superovulatory treatment should be studied with a bigger sample of cows, initiating the new treatment after natural oestrus and following the oestrous cycles of the cows for a longer period in order to demonstrate the possible disorders of the reproductive tract.</p>			
<p>Keywords</p> <p>bovine, embryo transfer, embryo flushing, superovulation, cool-transportation of fresh embryos</p>			

## SISÄLTÖ

1	JOHDANTO .....	6
2	NAUDAN KIIMAKIERTO.....	8
2.1	Kiimakiertoon vaikuttavat hormonit .....	9
2.2	Hedelmöittyminen ja tiineyden alkiovaihe .....	10
3	NAUDAN ALKIOHUUHTELU.....	13
3.1	Alkiohuuhteluohjelma .....	15
3.1.1	Nykyisin käytössä oleva superovulaatiokäsittelyohjelma .....	15
3.1.2	Vaihtoehtoisia superovulaatiokäsittelyohjelmia .....	16
3.2	Alkiohuuhtelun vaiheet .....	18
3.3	Alkioiden käsittely .....	20
3.3.1	Alkioiden luokittelu .....	21
3.3.2	Tuore- ja pakastealkiot .....	23
3.4	Alkionsiirron etuja .....	23
3.5	Alkionsiirron haasteita .....	24
4	TUTKIMUSMENETELMÄ.....	25
4.1	Koeasetelma .....	26
4.2	Aineiston keruu.....	27
4.2.1	Alkiohuuhteluiden toteutus ja alkioiden käsittely.....	29
4.2.2	Anti-Müllerian-hormonipitoisuuden määrittäminen .....	35
4.2.3	Tuorealkioiden viileäkuljetus .....	35
4.3	Tutkimusaineiston käsittely ja analysointi .....	37
4.4	Tutkimuksen luotettavuus .....	37
5	TUTKIMUKSEN TULOKSET .....	40
5.1	Alkiohuuhteluiden tulokset.....	40
5.2	Tuorealkioiden viileäsäilytyksen kestävyys .....	45
6	JOHTOPÄÄTÖKSET .....	48
7	PÄÄTÄNTÖ.....	52
	LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT .....	55

LIITE 1. TYHJÄ ALKIOHUUHTELUKAAVAKE

LIITE 2. VIILEÄSÄILYTYKSEN LÄPIKÄYNEIDEN TUOREALKIOIDEN JATKOKASVATUSTULOSTEN TAULUKKOPOHJA

LIITE 3. TUTKIMUKSEN ALKIOHUUHELUISSA KÄYTETYT TARVIKKEET

## 1 JOHDANTO

Lehmävasikan syntyessä sillä on munasarjoissaan valmiina satojatuhansia munarakkuloita, joissa munasolut ovat. Vasikan lisääntymispotentiaali on siis valtava. Lehmän elinaikana kuitenkin vain osa munarakkuloista kehittyy kypsiksi munarakkuloiksi, Graafin follikkeleiksi, eikä lehmä ehdi välttämättä tuottaa elämänsä aikana kuin ainoastaan muutamia jälkeläisiä. Alkionsiirto mahdollistaa sen, että geneettisesti arvokkaista naarasyksilöistä saadaan normaalia lisääntymispotentiaalia enemmän jälkeläisiä alkiohuuhtelun avulla. Alkioiden vastaanottajana voidaan käyttää puolestaan jalostuksen näkökulmasta huonompia eläimiä, joilta ei välttämättä haluta omia jälkeläisiä. Näin karjan eläinainesta saadaan parannettua nopeasti. (Aro, Hilpelä-Lallukka, Niemi, Toivonen ja Vahlsten 2012, 146–147.)

Tilatason jalostuksessa alkiohuuhtelut ja alkionsiirrot ovat vakiinnuttaneet paikkansa niin Suomessa kuin ulkomaillakin. Ensimmäinen naudan alkionsiirto toteutettiin vuonna 1951 kirurgisella menetelmällä, mutta vasta 1970-luvun loppupuolella alkionsiirron suosio lisääntyi ei-kirurgisen alkionsiirtomenetelmän ansiosta. Viime vuosina Suomessa on tehty noin 400 alkiohuuhtelua vuosittain ja alkionsiirtoja noin 3 000. Alkionsiirron useista hyödyistä huolimatta sen suosio on Suomessa viime vuosina hieman vähentynyt. (Taurén, 2016.)

Tämä opinnäytetyö pohjautuu erikoistutkija Heli Lindebergin tutkimukseen nimeltä ”Hitaasti follikkelia stimuloivaa hormonia (FSH) vapauttavan kantaja-aineen käyttö naudan alkiohuuhtelun superovulaatiokäsittelyssä”, jonka hän toteutti Luonnonvarakeskus Luke Maaningan tutkimuspihatossa (Cowlab™) syksyllä 2016. Opinnäytetyössä raportoidun tutkimuksen tavoitteena oli parantaa nykyisin käytössä olevaa naudan alkiohuuhtelun superovulaatiokäsittelyohjelmaa ja kehittää tuorealkioiden viileäkuljetusta. Uutta superovulaatiokäsittelyohjelmaa tutkivan kokeen tarkoituksena oli verrata nykyisin käytössä olevan kahdeksan hormonipistoksen superovulaatiokäsittelyohjelman kykyä tuottaa siirtokelpoisia alkioita uuteen kahden hormonipistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmaan. Kokeeseen valitut lypsylehmät superovuloitiin satunnaisessa järjestyksessä sekä nykyisin käytössä olevalla kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla että uudella kahden hormonipistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla. Mikäli nykyinen, raskas hormonikäsittely voitaisiin korvata kevyemmällä kahden pistoksen hormonikäsittelyllä, lypsykarjatilallisten kiinnostus alkiohuuhteluita kohtaan todennäköisesti lisääntyisi, ja siten eläinten jalostusta voitaisiin nopeuttaa. Uuden, kahden pistoksen menetelmän toimiessa eläimen tuntema epä mukavuus ja kipu vähenisivät. Lisäksi hoito olisi nykyistä yksinkertaisempi sekä kustannus- ja resurssitehokkaampi.

Kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmaa on aiemmin testattu hiehoilla Italiassa ja siitä on saatu hyvä tulos. Koeryhmän hiehot tuottivat keskimäärin 9,6 siirtokelpoista alkioita per huuhtelu uudella, kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla, kun taas kontrolliryhmältä saatiin keskimäärin 6,6 siirtokelpoista alkioita per huuhtelu kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla. Muualla vastaavaa tutkimusta ei tiettävästi ole tehty. (Biancucci ym. 2016.)

Luonnonvarakeskuksessa toteutetussa, superovulaatiokäsittelyohjelmia vertaavassa tutkimuksessa tuotetut siirtokelpoiset tuorealkiot käytettiin kokeeseen, jossa tarkasteltiin alkuiden viileäkuljetuksen kestävyyttä. Alkuiden viileäkuljetusta käytetään Suomessa ja maailmalla jo nykyisin jonkin verran lyhyillä välimatkoilla, sillä sen järjestäminen on usein helpompaa kuin pakastealkuiden kuljettaminen nestetyypisäiliössä. Lisäksi tuorealkiot tiineyttävät vastaanottajan tutkitusti hieman pakastealkioita paremmin. Etenkään suomalaista tutkimustietoa siitä, kuinka pitkään tuorealkiot pysyvät elinvoimaisina viileäsäilytyksessä, ei käytännössä vielä juurikaan ole.

## 2 NAUDAN KIIMAKIERTO

Hieho saavuttaa sukukypsyyden noin vuoden ikäisenä. Ikää voimakkaampi sukukypsyyden saavuttamisen määrääjä on kuitenkin hiehon paino. Hyvin kasvaneella ja voimakkaasti ruokitulla hieholla ensimmäinen kiima voi ilmetä jo selvästi ennen vuoden ikää, kun taas heikosti ruokitulla hieholla kiimakierto ei ole käynnistynyt ennen toivottua ensimmäistä siemennysajankohtaa, joka sijoittuu noin 15 kuukauden ikään hiehon koosta riippuen. Hiehon rotu, vuodenaika ja muut olosuhteet ovat vähäisempiä tekijöitä naudän ensimmäisen kiiman esiintymisessä. (Alasuutari, Manni ja Rautala 2010, 103; Rautala 1996, 102.)

Naudan kiimakierto kestää keskimäärin 21 vuorokautta lehmillä ja 20 vuorokautta hiehoilla, eli yleensä kiima toistuu noin kolmen viikon välein. 18–24 vuorokauden kiimavälejä pidetään normaalina. Usein kiimojen välillä saattaa kuitenkin olla vaihtelua jopa tätä enemmän. Kiimakierto voi olla epäsäännöllinen esimerkiksi toiminnallisen lisääntymishäiriön tai hoitajan virheellisten kiimahavaintojen takia. Alkiokuolemat ovat siemennetyillä yksilöillä merkittävä pitkien kiimavälien aiheuttaja. (Alasuutari ym. 2010, 98; Hulsén 2011, 71; Riihikoski 1991, 129–132.)

Kiimakierto voidaan jakaa neljään erilaiseen vaiheeseen, ja kierron lasketaan alkavan kiimapäivästä. Kiimakierron neljä vaihetta ovat esikiima, varsinainen kiima, jälkikiima ja keltarauhasvaihe, jota kutsutaan myös kiimojen väliseksi vaiheeksi. Esikiimassa lehmä etsii parittelukumppania hyppimällä toisten eläinten selkään ja on levoton. Vielä tässä vaiheessa se ei kuitenkaan salli toisten hyppiä selkäänsä. Muutoksia ulkoisissa sukuelimissä tapahtuu vähitellen: ne turpoavat ja alkavat punoittaa esikiiman loppuvaiheen lähestyessä. Kiimalima on paksua ja väriltään harmahtavaa, mutta esikiiman loppuvaiheessa alkaa esiintyä jo kirkasta limaa. Vuotoa on havaittavissa yleensä 1–3 vuorokautta ennen varsinaista kiimaa ja levottomuusoireita alkaa esiintyä noin vuorokautta ennen. (Alasuutari ym. 2010, 98–99.)

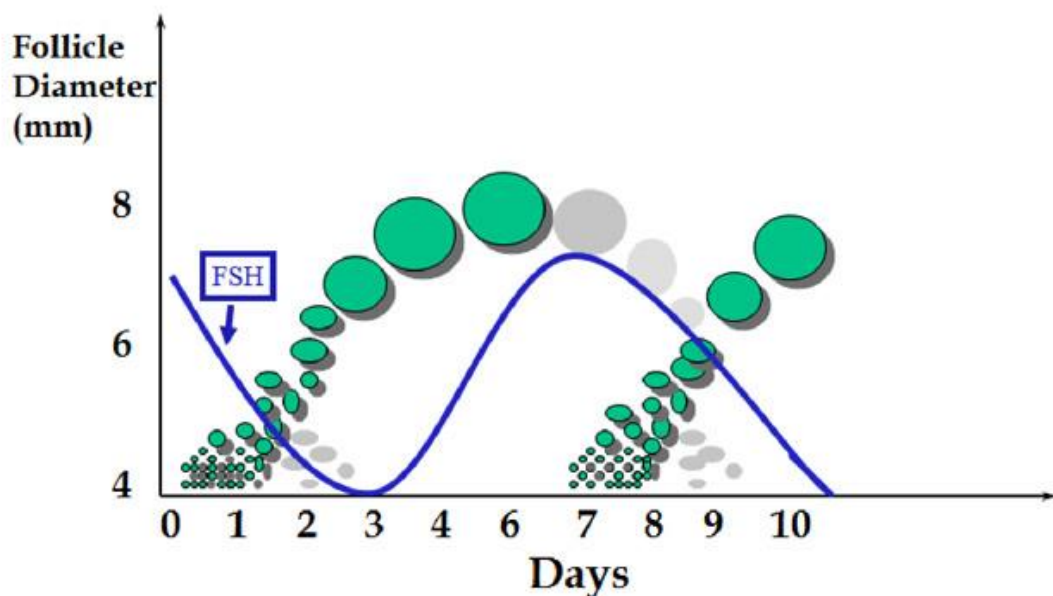
Varsinaisen, eli seisovan kiiman aikaan lehmä sallii toisen lehmän tai sonnin hypätä selkäänsä ja jää alle seisomaan paikoilleen. Se on luotettavin varsinaisen kiiman merkki. Tämä vaihe kestää keskimäärin 12–15 tuntia, mutta sen pituudessa esiintyy paljon vaihtelua. Normaalina kiiman keston ylärajana pidetään 30 tuntia. Lyhyet kiimat saattavat puolestaan kestää vain pari tuntia, jolloin se esimerkiksi yön aikana ohi mentyään tulkitaan hiljaiseksi kiimaksi. Kiimakäyttäytymiseen kuuluvat myös levottomuuden lisääntyminen ja liikunta-aktiivisuuden nousu. Lisäksi sukuelimistä valuu täysin kirkasta, venyvää limaa ja ulkoiset sukuelimet ovat hieman turvonneet sekä punoittavat. (Alasuutari ym. 2010, 98–99; Rautala 1996, 104.)

Varsinaisen kiiman jälkeen alkaa jälkikiima. Tällöin eläin ei anna toisten hyppiä selkäänsä, mutta se voi vielä olla innostunut itse hyppimään. Lima muuttuu sitkeäksi, eikä se ole enää väriltään täysin kirkasta. Suurimmalla osalla lehmistä esiintyy veristä vuotoa 1–2 vuorokautta varsinaisen kiiman jälkeen merkinä tapahtuneesta ovulaatiosta. (Alasuutari ym. 2010, 99.)



Kiimojen välisen vaiheen aikana munasarjoissa on toimiva keltarauhanen. Tämän vaiheen aikana niin maidon kuin veren progesteronipitoisuus on korkealla. Keltarauhasvaihe kestää noin kaksi viikkoa. (Alasuutari ym. 2010, 99.)

Yhden kiimakierron aikana naudalla on yleensä kahdesta kolmeen follikkeliaaltoa. Kun follikkeliaalto alkaa kehittyä, pienten follikkelien ryhmä alkaa kasvaa samanaikaisesti (kuvio 1). Muutamien päivien kuluessa yksi follikkeleista valikoituu dominoivaksi eli hallitsevaksi ja se jatkaa kasvuaan muiden follikkelien alkaessa surkastua. Mikäli munasarjoissa on toimiva keltarauhanen, dominoiva follikkeli ei voi ovuloitua, vaan se surkastuu. Sen jälkeen uusi follikkeliaalto alkaa kehittyä. (Mapletoft, Steward ja Adams 2002.)



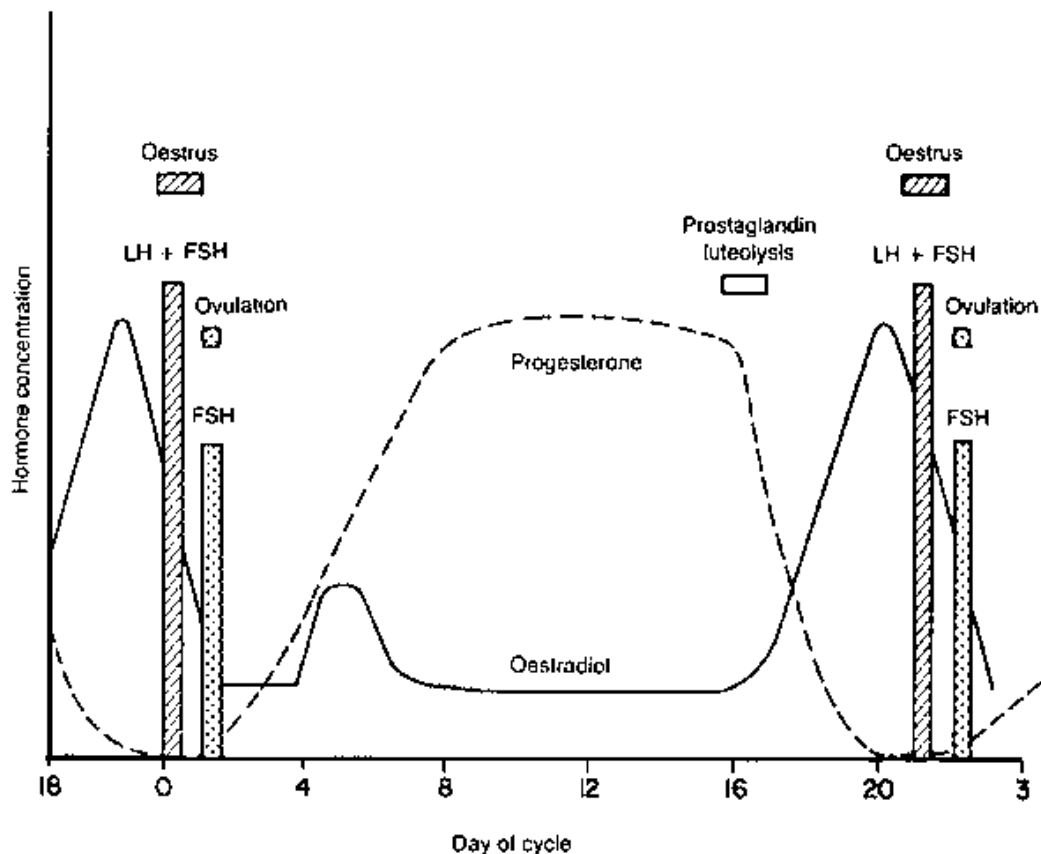
KUVIO 1. Naudan follikkeliaaltojen kehitys (Bayer s.a.)

Lehmän tai hiehon ollessa tiineenä kiimakierrat ovat seisahtaneet. Ne käynnistyvät yleensä noin kuukauden kuluttua poikimisesta. Poikimisen jälkeen mahdollinen nousut maitotuotos, kuntoluokan laskeminen ja sairastuminen voivat vaikuttaa kiimakierron käynnistymiseen sitä viivästyttäen. Usein ensimmäiset poikimisen jälkeiset kiimat ovat heikkoja, eikä niitä sen vuoksi huomata. (Alasuutari ym. 2010, 103–104.)

## 2.1 Kiimakiertoon vaikuttavat hormonit

Kiimakiertoon vaikuttavia hormoneita syntyy hypotalamuksessa, aivolisäkkeessä, munasarjoissa ja kohdun limakalvolla. Hormonierityksen vilkkaampi vaihe on muutamaa päivää ennen kiimaa esikiiman lopussa ja kiiman aikana (kuvio 2). Esikiiman lopussa hypotalamuksesta erittyvän GnRH:n (gonadotropiineja eli FSH:a ja LH:a vapauttava hormoni) ansiosta aivolisäkkeestä vapautuu FSH:a eli follikkelia stimuloivaa hormonia. FSH:n ansiosta munasarjassa kasvamaan valikoituneet munarakkulat eli follikkelit alkavat kasvaa kokoa ja follikkeleista erittyvän kiiman oireita voimistavan estrogee-

nihormonin pitoisuus veressä lisääntyy. Kiiman alkaessa yleensä yksi follikkeleista on valikoitunut hallitsevaksi ja muut kasvamaan lähteneet follikkelit ovat surkastuneet. Hallitseva follikkeli tuottaa yhä lisääntyvässä määrin estrogeenihormonia, jonka korkean pitoisuuden vaikutuksesta hypotalamuksen GnRH saa aikaan LH:n lyhytaikaisen noin 100-kertaisen erittymispiikin aivolisäkkeestä. LH eli luteinisoiva hormoni saa aikaan hallitsevan follikkelin loppukypsytymisen, munasolun irtoamisen hallitsevasta follikkelista ja sen jälkeen keltarauhasen (corpus luteum = CL) muodostumisen. (Lindeberg, 2017; Riihikoski 1991, 129–130.)



KUVIO 2. Hormonipitoisuuksien muutokset kiimakierron eri vaiheissa (FAO, s.a.)

Hormonierityksen rauhallisempi, toinen vaihe alkaa keltarauhasen erittäessä progesteronihormonia. Progesteroni estää vapauttajahormoni GnRH:n muodostumista aivoissa, mutta perustason pulsseina muodostuu kuitenkin LH:a ja FSH:a. Mikäli eläin tulee kantavaksi, progesteronihormoni estää kiimojen esiintymisen tiineysaikana. Kolmas hormonierityksen vaihe tapahtuu kohdun limakalvolla kiimakierron loppupuolella. Kohdun limakalvolla muodostuu prostaglandiinihormonia, joka surkastuttaa keltarauhasen ja vapauttajahormoni GnRH:a alkaa erittyä aivoissa. Tätä seuraa uusi kiima ja uusi munasolun irtoaminen. (Lindeberg, 2017; Riihikoski 1991, 130.)

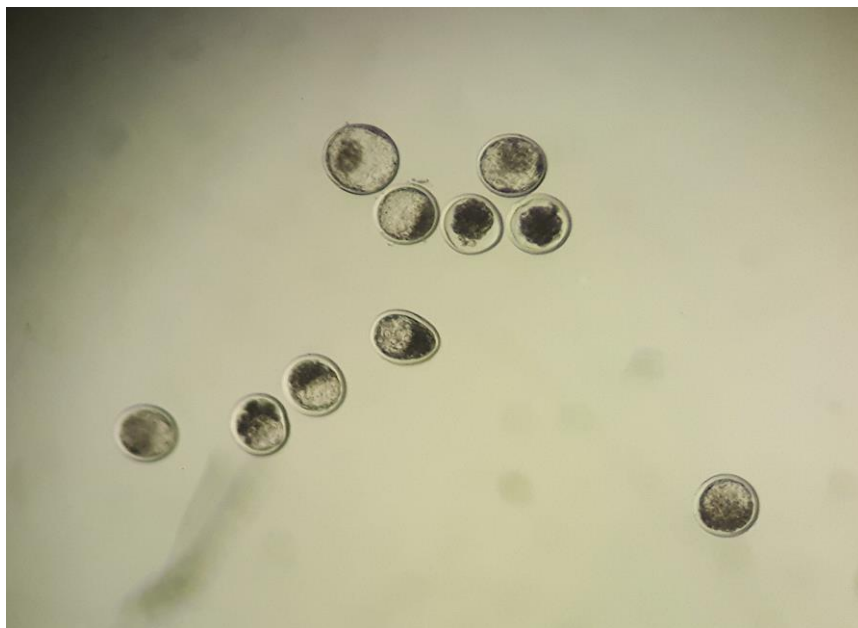
## 2.2 Hedelmöittyminen ja tiineyden alkiovaihe

Munasolut sijaitsevat munarakkuloiden eli follikkeleiden sisällä munasarjoissa. Ainoastaan osa munarakkuloista kehittyy yksilön elinaikana Graafin follikkeleiksi eli kypsiksi ovuloituviksi munarakkuloiksi.

Lehmän ollessa kiimassa sen munasarjoista irtoaa yleensä yksi munasolu tai joskus kaksi munasolua, jolloin voi syntyä kaksoset. Munasolu kehittyy ja kypsyy follikkelin sisällä munasarjassa. Seiso- van kiiman alusta noin 30 tunnin sisällä follikkeli puhkeaa ja tapahtuu ovulaatio. Ovulaation jälkeen follikkelinesteensä tyhjentäneestä follikkelista kehittyy keltarauhanen. Keltarauhanen ylläpitää tiineyttä. Follikkelinesteen mukana irronnut munasolu kulkeutuu munanjohtimeen. Kun lehmän mu- nanjohtimiin ja kohtuun kulkeutuu sonnin siemennestettä, munasolu hedelmöittyy, hedelmöittynyt munasolu alkaa jakaantua ja syntyy alkio. Alkion solut alkavat vähitellen erikoistua omiin tehtäviinsä. (Aro ym. 2012, 146–147).

Naudan alkio saapuu kohtuun 3–4 vuorokauden kuluttua hedelmöityksestä soluvaiheessa 8 tai 16. Seitsemän vuorokauden ikäinen blastokysti- eli ontelovaiheinen alkio on kohdunsarven kärjessä. Se on munasolun keton (*zona pellucida*) sisällä oleva 0,15 millimetrin kokoinen solupallo, eivätkä alkion solut ole vielä erikoistuneet. Mikäli lehmälle tehdään alkiohuuhtelu, se tehdään seitsemäntenä päi- vänä huuhtelusiemennyksestä. Tuolloin alkiot (kuva 1) ovat saapuneet jo kohtuun, mutta ne eivät yleensä vielä ole kuoriutuneet alkion ulomman kerroksen eli munasolun keton sisältä tai kiinnitty- neet. Alkion ulomainen kerros suojaa alkioita muun muassa taudinaiheuttajilta. Pian kohtuun saa- pumisensa jälkeen alkio kuoriutuu, alkaa kehittyä rihmamaiseksi, jotta voi levittäytyä koko kohdun alueelle tiedottaakseen omasta olemassaolostaan ja alkaa kiinnittyä kohdun seinämään normaalisti noin 18-22 vuorokauden kuluttua hedelmöitymisestä. (Aro ym. 2012, 147; Lindeberg 2017.)

Jotta alkionsiirto onnistuu, alkion vastaanottajan on oltava samassa kiimakierron vaiheessa kuin alkion luovuttajan. Tuolloin olosuhteet vastaanottajan kohdussa ovat suotuisat siirretyn alkion kiinnit- tymiselle. Lisäksi on varmistettava, että vastaanottajalla on toimiva keltarauhanen, joka ylläpitää tiineyttä. Noin puolet alkionsiirroista onnistuu. (Lindeberg 2017.)



KUVA 1. Naudan huuhtelualkioita stereomikroskoopissa 60-kertaisella suurennoksella (Kukkonen, 2016-08-24).

Kun alkion elimet ja raajat ovat näkyvissä, siitä aletaan käyttää nimitystä sikiö. Tuolloin naudan tiineys on kestänyt 45 vuorokautta. Kahden kuukauden kuluttua hedelmöitymisestä kohtu on noin 7 senttimetriä leveä ja se alkaa painua vatsaonteloon. Kun tiineys on kestänyt neljä kuukautta, kohtu on painunut jo täysin vatsaonteloon ja vasikka on suurin piirtein kissan kokoinen. Lehmän tiineys kestää noin 280 vuorokautta. (Juga ym. 1999, 279; Ranta 2012, 3.)

### 3 NAUDAN ALKIOHUUHTELU

Ensimmäinen onnistunut naudan alkiohuuhtelu tehtiin kirurgisella menetelmällä 1950-luvulla. Ensimmäiset kaupalliset alkiosierrot tehtiin Pohjois-Amerikassa 1970-luvulla. Vasta 1970-luvun loppupuolella alkionsiirtojen ei-kirurginen toteutustapa yleistyi ja sen myötä alkionsiirron suosio lisääntyi. (Selk s.a.)

Myös Suomessa ensimmäinen alkiohuuhtelu tehtiin 1970-luvulla. Alkiokeskuksen perustamisen myötä vuonna 1986 alkiohuuhteluita ja alkionsiirtoja alettiin tehdä myös tiloilla. Palvelujen saatavuuden laajeneminen koko Suomeen ja ydinkarjahankkeen käynnistyminen edistivät alkionsiirtojen ja alkiohuuhteluiden suosion lisääntymistä. Maailmalla toimii useita alkionsiirto-organisaatioita, joiden kattojärjestönä toimii IETS (International Embryo Technology Society), joka perustettiin vuonna 1974. Euroopan alueella toimii AETE (Association of Embryo Technology in Europe). (Aro ym. 2012, 145–146; Mapletoft 2013.)

Vuosittainen alkiohuuhteluiden lukumäärä ei ole vaihdellut kovin paljoa tarkastelujaksolla (kuvio 3). Viime vuosina alkiohuuhtelujen lukumääräksi on vakiintunut noin 400 huuhtelua vuodessa. Huuhtelujen huippuvuonna 2004 Suomessa tehtiin jopa 547 alkiohuuhtelua. Faban tilastosta näkyy suurin osa Suomessa tehdyistä, ilmoitetuista alkiohuuhteluista sekä alkionsiirroista. (AETE 2016; Taurén 2016.)

Alkioiden ja munasolujen kerääminen on Suomessa luvanvaraista toimintaa, ja siitä on säädetty laissa: ”Alkioita, joista voi aiheutua vastustettavien eläintautien leviämisen vaaraa, saa kerätä luovuttajaeläimistä vain hyväksytyt alkioiden keräysryhmä. Mainittuja alkioita saa tuottaa kerätyistä munasoluista koeputkihedelmöityksellä vain hyväksytyt alkioiden tuotantoryhmä.” (Eläintautilaki 441/2013, § 46.) Suomessa toimii kaikkiaan neljä alkior ryhmää, jotka ovat Viking Genetics Finland Oy (FIN-AK1), Luonnonvarakeskus Vihreä Teknologia (FIN-AK4), HH-Embryo Oy (FIN-AK9) ja ET Faba Osk (FIN-AK10). Luonnonmukaisessa tuotannossa alkionsiirto ei ole sallittua. (Elintarviketurvallisuusvirasto 2016a; Elintarviketurvallisuusvirasto 2016b; eläintautilaki 441/2013, § 46.)



KUVIO 3. Kaaviossa näkyvät Faban alkiohuuhtelut ja alkionsiirrot vuosina 2002–2015 (Taurén 2016).

Alkionsiirtojen huippuvuosi oli vuonna 2011, jolloin tehtiin yli 4 000 alkionsiirtoa, mutta niiden lukumäärä on vähentynyt viime vuosina. Vuoteen 2013 saakka alkioryhvät lähettivät toimintatilastot ja tulokset Maa- ja metsätalousministeriöön. Sen jälkeen kotieläinjalostuslaki muuttui ja tällaisesta käytännöstä on luovuttu. Siitä johtuen tarkkaa lukua koko Suomessa tehdyistä alkiohuuhteluista tai alkionsiirroista ei ole saatavilla. (Taurén 2016.)

Ranskassa, Alankomaissa, Saksassa ja Italiassa vuonna 2015 alkiohuuhteluita sekä -siirtoja tehtiin eniten koko Euroopan alueella. Vähiten niitä tehtiin Tšekissä, Sloveniassa, Kreikassa ja Ukrainassa. Bosnia-Hertsegovina, Kroatia, Viro, Latvia, Makedonia, Serbia, Slovakia ja Turkki ovat ilmoittaneet, etteivät ole tehneet vuonna 2015 alkionsiirtoja tai alkiohuuhteluita ollenkaan. (AETE 2016.)

TAULUKKO 1. Naudan huuhtelu- eli *in vivo* alkioiden lukumäärät alueittain vuonna 2015 (IETS 2016.)

Alue	<i>In vivo</i> -tuotettujen alkioiden tunnuslukuja		% maailmanlaajuisesta alkiontuotannosta
	Huuhteluiden lukumäärä	Siirtokelpoisia alkioita per huuhtelu	
Afrikka	711	7,78	0,84
Aasia	14 689	7,19	16,01
Eurooppa	20 497	6,24	19,38
Etelä-Amerikka	8 953	5,56	7,55
Oseania	2 353	4,75	1,69
Pohjois-Amerikka	53 536	6,72	54,53
Yhteensä	100 739	6,55	100,00

Pohjois-Amerikassa alkioita tuotetaan eniten, yli puolet koko maailman alkioista, kun taas vähiten niitä tuotetaan Afrikassa (taulukko 1). Selkein muutos vuoteen 2015 on tapahtunut Oseanian alueella, jossa siirtokelpoisten alkioiden lukumäärä on noussut yli puolella vuodesta 2014. On kuitenkin huomattava, että tilastoissa on mukana 225 maasta ainoastaan 50 (22,22 prosenttia). (IETS 2016, 1–2.)

Alkioita voidaan tuottaa myös laboratoriossa. Tuolloin puhutaan koeputkialkiotuotannosta (IVP = *in vitro embryo production*). Munasoluja voidaan kerätä joko teurastetun tai elävän eläimen munasarjoista. Kun munasoluja kerätään ultraääniavusteisesti elävästä eläimestä, käytetään nimitystä OPU-tekniikka (*ovum pick-up*). Teurasmunasarjoista tai elävästä eläimestä kerätyistä munasoluista tuotetaan koeputkialkioita siten, että munasolut kypsytetään ensin, minkä jälkeen ne hedelmöitetään joko tavallisella tai sukupuolilajitellulla pakastesiemennesteellä. Mahdolliset hedelmöittyneet munasolut kasvatetaan alkioiksi kasvatusliuoksessa seitsemän vuorokautta ja sen jälkeen alkioita joko pakastetaan nestetyyppien myöhempää siirtoa varten tai siirretään vastaanottajaan tuorealkioina. Kaikki

koeputkialkiot siirretään vastaanottajaan seitsemän päivän ikäisinä alkioina. (Aro ym. 2012, 156–157; Lindeberg 2015.)

TAULUKKO 2. Naudan OPU IVP-alkioiden lukumäärät alueittain vuonna 2015 (IETS, 2016).

Alue	OPU-menetelmällä tuotettujen koeputkialkioiden lukumäärä
Afrikka	3 733
Aasia	9 438
Eurooppa	13 780
Etelä-Amerikka	369 820
Oseania	3 892
Pohjois-Amerikka	212 046
Yhteensä	612 709

Alkioiden tuotanto elävän eläimen munasarjoista kerätyistä munasoluista *in vitro* -menetelmän avulla on suosittua maailmalla (taulukko 2). Vuonna 2015 IETS:in mukaan kaikista alkioista 49,6 prosenttia oli tuotettu huuhtelemalla (*in vivo* -menetelmä) ja 50,4 prosenttia koeputkessa (*in vitro* -menetelmä). Koeputkialkioista 91,3 prosenttia tuotettiin vuonna 2015 elävän eläimen munasarjoista imetyistä munasoluista ja 8,7 prosenttia teurastamomunasarjoista imetyistä munasoluista. *In vitro* -menetelmän avulla on saatu tuotettua tuhansia alkioita muun muassa tieteen käyttöön – niiden tuottaminen on usein resurssitehokkaampaa kuin *in vivo* -alkioiden. (IETS 2016; Mapletoft 2013.)

### 3.1 Alkiohuuhteluohjelma

Alkiohuuhtelua edeltävän superovulaatiohormonikäsittelyn tavoitteena on se, että alkioita luovuttavan eläimen munasarjoissa saadaan samanaikaisesti kehittymään ja hormonikäsittelyä seuraavan kiiman aikana ovuloitumaan yhden munasolun sijasta mahdollisimman monta, jopa kymmeniä munasoluja. Tästä käytetään nimitystä superovulaatio. Follikkelia stimuloivaa FSH:a kutsutaan superovulaatiohormoniksi. Kun useat munasolut irtoavat lähes yhtä aikaa ja hedelmöittyvät munanjohtimessa, voidaan lehmän kohdusta huuhdella lukuisia alkioita noin viikon kuluttua huuhtelusiemenyksistä. (Aro ym. 2012, 150.)

Huuhteluohjelman (taulukko 3) ja tilakohtaiset ohjeet huuhteluohjelman toteuttamisesta laatii aina alkionsiirtoeläinlääkäri. Huuhteluohjelma kestää alusta loppuun noin kuukauden. Ohjelma alkaa luovuttajaeläimen tarkastuksella. Huuhteluohjelmaa ei voida aloittaa, mikäli munasarjoista ei löydetä toimivaa keltarauhasta. (Aro ym. 2012, 150.)

#### 3.1.1 Nykyisin käytössä oleva superovulaatiokäsittelyohjelma

Huuhteluohjelma alkaa päivänä 0, jolloin lehmällä tai hieholla on aloituskiima (taulukko 3). Se on joko luonnollinen tai kierukan tai prostaglandiinipistoksen avulla aikaansaatu. Reilun viikon kuluttua aloituskiimasta luovuttajaeläimen munasarjat tarkastetaan ja mikäli löydetään toimiva keltarauha-

nen, voidaan ohjelma aloittaa vapaavalintaisesti kiimakierron päivinä 9-12 antamalla superovulaatiohormonia pistoksina lihakseen alenevalla annoksella neljän päivän ajan, 12 tunnin välein. Hormonikäsittelyn kolmantena ja neljäntenä päivänä eläimelle annetaan lisäksi pistoksena lihakseen prostaglandiinihormonia, minkä jälkeen luovuttaja tulee kiimaan ja sille tehdään huuhtelusiemennykset, 2–3 huuhtelusiemennystä 9–15 tunnin välein. (Aro ym. 2012, 150.)

TAULUKKO 3. Esimerkki huuhteluohjelmasta, jossa luovuttajaeläimen kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittely on aloitettu kiimakierron päivänä 9 (Aro ym. 2012, 150; Lindeberg 2017.)

Päivä	Luovuttajaeläin	Vastaanottajaeläimet
0	Aloitustiima	
8	Luovuttajan munasarjojen tarkastus	
9	Superovulaatiohormonilääkitys x 2 (12 tunnin välein)	
10	Superovulaatiohormonilääkitys x 2 (12 tunnin välein)	
11	Superovulaatiohormonilääkitys x 2 (12 tunnin välein), prostaglandiinipistos	Prostaglandiinipistos
12	Superovulaatiohormonilääkitys x 2 (12 tunnin välein), prostaglandiinipistos	
14	Kiima, huuhtelusiemennys 2-3 kertaa 9-15 tunnin välein	Kiima
20		(Keltarauhasen tarkastus)
21	Alkioiden huuhtelu	Keltarauhasen tarkastus ja alkioiden siirto
24	Prostaglandiinipistos	

Koska vastaanottajan on oltava samassa kiimakierron vaiheessa alkionsiirron onnistumisen varmistamiseksi, myös sille annetaan prostaglandiinipistos luovuttajan hormonikäsittelyn kolmantena päivänä. Tällöin vastaanottaja tulee kiimaan samanaikaisesti luovuttajan kanssa, mutta vastaanottajaa ei kiiman aikana siemennetä. Alkiohuuhtelu tehdään viikon kuluttua ensimmäisestä huuhtelusiemennyksestä. (Aro ym. 2012, 150.)

### 3.1.2 Vaihtoehtoisia superovulaatiokäsittelyohjelmia

Yleisesti alkiohuuhtelun yhteydessä käytetään kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmaa, mutta myös vaihtoehtoisia superovulaatiokäsittelyohjelmia tutkitaan. Tässä luvussa kuvataan Biancuccin ym. (2016) tutkimus. He toteuttivat Italiassa tutkimuksen, jossa superovulaatiohormoni pFSH:a annettiin pistoksena lihakseen kahdeksan kerran sijasta kaksi kertaa. Tutkimus toteutettiin hiehoilla, joiden yleisesti oletetaan reagoivan hormonikäsittelyihin lehmä varmemmin. Hiehoilla ei ole lypsyrasitusta, joten ne tuottavat alkioita todennäköisemmin kuin lehmät (Lindeberg 2017).



Tässä italialaisen tutkimusryhmän tutkimuksessa kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmaa testattiin pihvirotuisilla hiehoilla. Tutkimuksen hypoteesi oli se, että molemmilla ohjelmilla saadaan sama tulos. Samalla tutkimuksessa seurattiin kortisolitasoja eläinten karvoista, sillä sen avulla voitiin seurata yksilön stressitasoa. Tutkimukseen valittiin 32 hiehoa, joiden kuntoluokka oli noin 3 ja jotka painoivat keskimäärin  $630 \text{ kg} \pm 68 \text{ kg}$  ( $\pm$  keskihajonta). Eläimet olivat pihatossa, jossa oli lukkoparret ruokintapöydän puoleisella sivulla, joihin kaikki eläimet saatiin kiinni yhtä aikaa. Eläinten tasapainoisesta ja riittävästä ravinnosta sekä vapaasta pääsystä vesipisteelle pidettiin huolta. (Biancucci ym. 2016.)

Kahdeksan viikkoa ennen kokeen aloitusta kaikkien hiehojen kohtu ja munasarjat tutkittiin ultraäänilaitteen avulla kolme kertaa viikossa. Kokeeseen valittiin kiimakierroltaan säännölliset ja lisääntymiselimiltään terveet eläimet. Ennen kutakin käsittelyä kiimakierrot synkronoitiin prostaglandiinipistoksella lihakseen 11 päivää ennen superovulaatiokäsittelyohjelman alkamista = päivä 0. Hiehot jaettiin satunnaisesti kahteen ryhmään ja ne superovuloitiin kahdesti eri tavoin: nykyisin käytössä olevalla kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla ja tutkittavalla kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla. Käsittelyjen välissä oli kuitenkin vähintään 60 päivän tauko. (Biancucci ym. 2016.)

Kontrolliryhmän käsittely oli tavanomainen kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma, jossa hiehoille annettiin alenevalla annoksella neljän päivän ajan 12 tunnin välein Pluset-valmistetta (superovulaatiohormonivalmiste) laimennettuna suolaliuokseen ja koeryhmän käsittely oli uusi superovulaatiokäsittelyohjelma, jossa Pluset-valmiste laimennettiin hyaluronihapon ja suolaliuoksen seokseen (kaksi pistosta 48 tunnin välein, ensimmäisellä pistokerralla kaksi kolmasosaa kokonaistilavuudesta ja toisella pistokerralla loput yksi kolmasosa kokonaistilavuudesta). Seoksen tarkoituksena oli aikaansaada pitkäaikaisempi ja tasaisempi superovulaatiohormonin imeytyminen pistoskohdasta kuin annettaessa pelkästään superovulaatiohormonia. Molempiin ohjelmiin kuului, että kolmantena päivänä ohjelman alusta hiehoille annettiin pistoksena lihakseen prostaglandiinia kaksi kertaa päivässä, 12 tunnin välein alkaen kolmannen päivän aamusta. Prostaglandiinia annettiin kaksinkertainen annos, jotta keltarauhasen surkastuminen varmistettiin. Kaikki hiehot huuhtelusiemenettiin sulatetulla pakastesiemennesteellä kolme kertaa, 48, 60 ja 72 tuntia ensimmäisen prostaglandiinipistoksen jälkeen. (Biancucci ym. 2016.)

Hiehot alkiohuuhdeltiin ei-kirurgisella menetelmällä superovulaatiokäsittelyohjelman 12. päivänä. Alkiot haettiin suodattimen huuhtelunesteestä mikroskoopin avulla. Alkiot myös arvioitiin eri luokkiin. Ensimmäisen huuhtelun jälkeen annettiin heti prostaglandiinia pistoksena lihakseen, ja 24 tuntia huuhtelun jälkeen annettiin vielä toisen kerran prostaglandiinia pistoksena lihakseen siltä varalta, ettei hiehon kohtuun vahingossa jäänyt alkioita, jotka lähtivät kehittymään. Satunnaisotannalla molemmista ryhmistä valittiin 14 hiehoa (yhteensä 28 hiehoa), joiden karvoista tehtiin kortisolianalyysi. Ensimmäinen karvanäyte otettiin päivänä 0, toinen 14. päivänä ja kolmas 21. päivänä. Tutkimuksen kaikki tilastolliset analyysit tehtiin SPSS-ohjelmalla. (Biancucci ym. 2016.)

Ryhmien välillä ei ollut eroa siinä, kuinka paljon follikkeleita alussa oli (follikkelien lukumäärä vaihteli 10–40 välillä). Korrelaatio follikkelien lukumäärän ja munasarjojen hoitoon reagoinnin välillä löydettiin, aivan kuten aiemmissakin tutkimuksissa. Kahdella kontrolliryhmän hiehoista oli alle kolme keltarauhasta ja ne luokiteltiin hoitoon reagoimattomiksi. Koeryhmän kaikilla hiehoilla oli huuhteluhetkellä enemmän kuin kolme keltarauhasta. Kuusi kaikista 32 hiehosta ei tuottanut yhtään siirtokelpoista alkioita, viisi näistä oli kontrolliryhmässä ja yksi koeryhmässä. Kahdella koeryhmän hieholla oli keltarauhasia enemmän kuin 30. (Biancucci ym. 2016.)

Tutkittu superovulaatiokäsittelyohjelma lisäsi merkittävästi munasarjojen reagointia käsittelyyn ja keltarauhasten lukumäärää. Ovulaatioaste, käsittelyyn reagoineiden hiehojen lukumäärä ja kehittyneiden follikkelien lukumäärä ei vaihdellut ryhmien välillä. Tutkittu käsittely lisäsi huuhtelun alkio- ja munasolusaantoa ja hedelmöittyneiden munasolujen lukumäärää. Se myös lisäsi tilastollisesti merkittävästi siirtokelpoisten ja pakastuskelpoisten alkoiden lukumäärää. Tilastollisesti merkittävää kasvua oli myös erinomaisten ja hyvien alkoiden lukumäärissä. Karvanäytteiden kortisolitasoissa ei ollut eroa päivänä 0, mutta 14. ja 21. päivän näytteiden kortisolitaso kontrolliryhmässä oli tilastollisesti merkittävästi korkeampi kuin koeryhmässä. (Biancucci ym. 2016.)

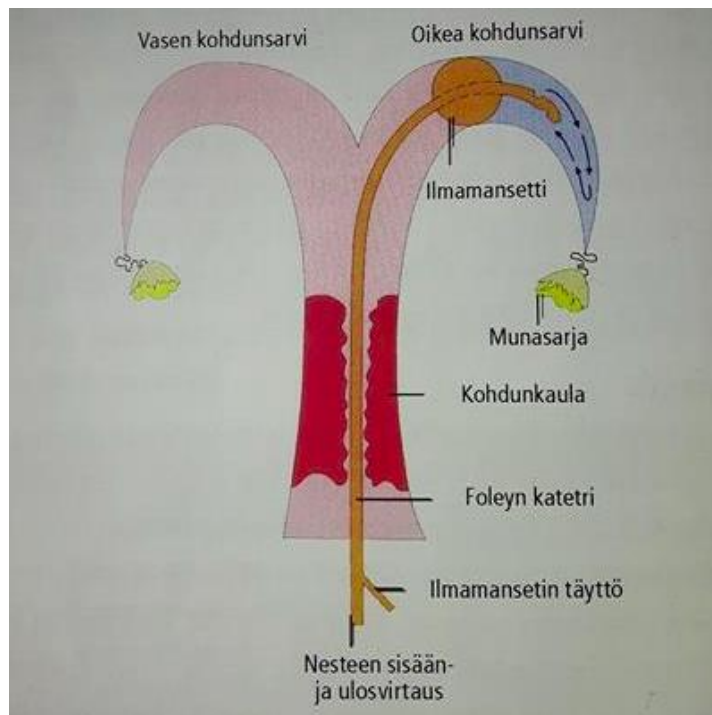
Kaiken kaikkiaan tutkittu menetelmä oli tehokas follikkeleiden kasvun kiihdyttäjänä ja johti tässä tutkimuksessa parempaan alkiosaantoon kuin nykyisin käytössä oleva superovulaatiokäsittelyohjelma. Koeryhmälle toteutettu protokolla vaikutti italialaisen tutkimusryhmän kokeen olosuhteissa varmemmalle ja tasaisemmalle, sillä tulokset elinkelpoisten alkoiden tuotossa olivat tasaisemmat koeryhmässä. Lisäksi koeryhmässä oli vähemmän sellaisia luovuttajia, jotka eivät tuottaneet ollenkaan siirtokelpoisia alkioita. Koeryhmän hiehojen karvan kortisolitaso oli alhaisempi, mikä ilmeisesti myös osaltaan paransi käsittelyyn reagointia. Tutkimuksen hypoteesi varmistui oikeaksi: tutkittu, uusi superovulaatiokäsittelyohjelma oli yhtä hyvä kuin nykyisin käytössä oleva käsittelyohjelma. Uuden ohjelman tasaisempi FSH-pitoisuus saattoi myös vaikuttaa alkoiden laatuun parantavasti. (Biancucci ym. 2016.)

### 3.2 Alkiohuuhtelun vaiheet

Kun alkiohuuhtelu tehdään viikon kuluttua ensimmäisestä huuhtelusiemennyksestä, alkiot ovat jo saapuneet kohtuun, mutta ne eivät vielä ole kuoriutuneet. Kuoren ansiosta alkio on helpompi löytää stereomikroskoopin avulla ja toisekseen kuori suojaa alkioita sitä käsiteltäessä. Koska alkio on viikon ikäinen, se siirretään sellaiseen eläimeen, joka on ollut viikko sitten kiimassa. (Aro ym. 2012, 153–155; Faba 2017.)

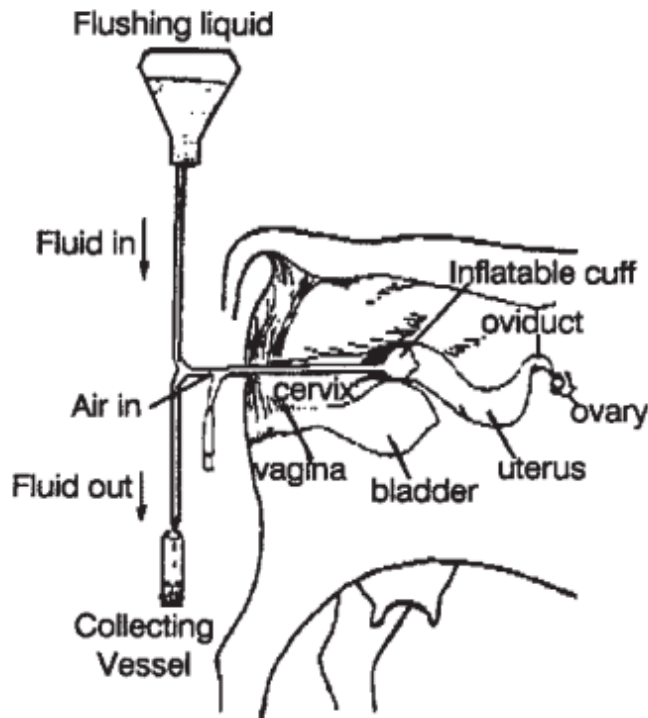
Alkiohuuhtelun tekee alkionsiirtoeläinlääkäri. Lisäksi hän tarvitsee huuhteluun ainakin yhden avustajan. Luovuttajaeläin tuodaan puhtaaseen paikkaan, jossa se ei pääse liikkumaan kovin paljoa. Huuhtelupaikan tulee olla myös valoisa, lämmin ja siten tilava, että huuhteltavan lehmän läheisyyteen mahtuu siirrettävä pöytä. (Aro ym. 2012, 151.)

Huuhdeltavalle lehmälle annetaan selkäydin- eli epiduraalipuudutus. Puudutuksen ansiosta peräsuolen supistelut lakkaavat kokonaan tai lähes kokonaan hetkeksi, joka helpottaa eläinlääkärin työskentelyä peräsuolen kautta. Onnistuessaan puudutus aiheuttaa myös sen, ettei lehmä tunne toimenpiteestä mitään. Mikäli eläin on kovin vilkas, sille saatetaan antaa hieman rauhoitusta, jotta se malttaa seistä paikoillaan huuhtelun ajan. Kun puudute on vaikuttanut, lehmän häntä muuttuu rennoksi ja se on helppo sitoa sivulle narun avulla, eikä se näin ollen ole tiellä toimenpiteen aikana. (Aro ym. 2012, 152.)



KUVA 2. Huuhtelukatetri naudan kohdussa (Aro ym. 2012, 152).

Ensimmäiseksi hävyn seutu puhdistetaan huolellisesti 70 prosenttisella alkoholilla. Huuhtelukatetri viedään jäykistimen avulla emättimen ja kohdunkaulan kautta jompaankumpaan kohdunsarveen ja jäykistintä ulosvetämällä samanaikaisesti työnnetään eteenpäin mahdollisimman pitkälle kohdunsarveen. Kohdunsarvi suljetaan katetrin ilmapallukan avulla, jolloin huuhteluneste kiertää kohdunsarven kärjessä, eikä neste pääse karkaamaan muualle kohtuun (kuva 2). Kohdunsarvi täytetään ja tyhjennetään useita kertoja huuhtelunesteellä. Huuhtelunestepussi sijoitetaan selkeästi lehmää korkeammalle, jotta neste virtaa kohdunsarveen mahdollisimman hyvin (kuva 3). Jotta kaikki alkiot saadaan huuhdeltua nesteen mukana ulos kohdunsarvesta, sitä nostellaan ja käännellään täyttöjen aikana. Kohdunsarvea huuhdellut neste kulkee edelleen suodattimen kautta, johon alkiot jäävät. Kun ensimmäinen kohdunsarvi on huuhdeltu, sama toistetaan toiselle puolelle. (Aro ym. 2012, 152.)



KUVA 3. Kaavakuva alkiohuuhtelusta (Selk s.a).

Yhdellä huuhtelukerralla luovuttajaeläimestä saatujen alkioiden lukumäärä voi vaihdella nolasta yli 30 alkioon. Vuonna 2010 siirtokelpoisia alkioita saatiin keskimäärin 8,7 per huuhtelu. Noin 15 prosenttia huuhteluista on sellaisia, ettei niistä saada lainkaan siirtokelpoisia alkioita. Alkiosaantoon vaikuttavat muun muassa huuhteluohjelman hormonikäsittely, eläimen hoito, kunto ja ruokinta, huuhtelusiemennysten ajoitusten onnistuminen, käytetty siemenneste (normaalia/ sukupuolilajiteltua) ja varsinaisen huuhtelun onnistuminen tai epäonnistuminen. (Aro ym. 2012, 151.)

### 3.3 Alkioiden käsittely

Alkiohuuhtelun jälkeen alkiot haetaan huuhtelunesteestä stereomikroskoopin avulla ja niiden laatu sekä kehitysaste arvostellaan (Aro ym. 2012, 153). Huuhtelusaalissa saattaa olla siirtokelpoisten alkioiden lisäksi surkastuneita eli degeneroituneita alkioita ja hedelmöittymättömiä munasoluja. Nämä poistetaan siirtokelpoisten alkioiden joukosta ja huuhtelupäivän päätteeksi hävitetään. Siirtokelpoisen alkion on oltava kaikin puolin laadukas ja elinkelpoinen, jotta alkionsiirto onnistuu. Alkioiden arvioinnilla on siis ratkaiseva merkitys siirron onnistumisen kannalta, joten kehitysvaiheen ja laadun arviointi ovat alkionsiirron tärkeimmät vaiheet. (Bó ja Mapletoft 2013; Lindeberg, 2017; Mapletoft 2006.)

Alkioiden arviointi tehdään stereomikroskoopilla, 50–100 -kertaisella suurennoksella. Sen jälkeen alkiot pestään, imetään siirto-olkiin ja joko siirretään tuoreina, noin vuorokauden sisällä vastaanottajiin tai pakastetaan. Yleensä alkioita säilytetään alkuperäisen huuhtelunesteen kaltaisessa liuoksessa. (Mapletoft 2006.)

### 3.3.1 Alkioiden luokittelu

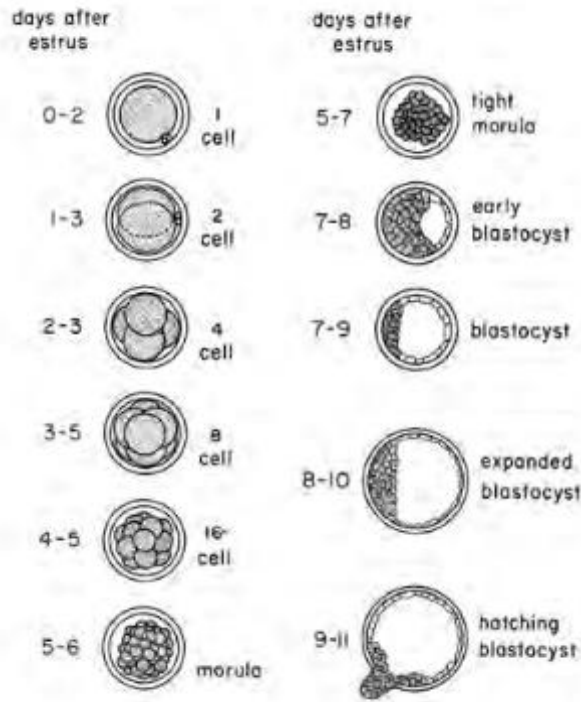
Alkion kehitysaste kertoo parhaiten sen elinvoimaisuudesta. Alkion kehitysastetta verrataan siihen, kuinka pitkälle kehittynyt alkion tulisi kyseisenä päivänä ovulaation jälkeen olla. Alkioiden kehitys luokitellaan IETS:in standardisoidun asteikon avulla (taulukko 4). (Bó ja Mapletoft 2013.)

TAULUKKO 4. Alkioiden kehitysasteikko (Bó ja Mapletoft 2013).

Luokka	Kuvaus
1	Hedelmöittymätön munasolu tai 1-soluinen alkio
2	2–12 -soluinen alkio
3	Varhainen morula
4	Morula
5	Varhainen blastokysti
6	Blastokysti
7	Laajentunut blastokysti
8	Kuoriutuva blastokysti
9	Kuoriutunut blastokysti

Alkioiden eri kehitysasteita havainnollistaa kuva 4. Ihanteellinen alkio on tiivis ja pallomainen. Alkiota arvioitaessa on tärkeää tunnistaa niiden eri kehitysasteet ja verrata alkiota kehitysasteeseen, jossa alkion tulisi huuhtelupäivänä olla. Yleensä alkiot huuhdellaan seitsemäntenä päivänä seisovasta kiimasta, jolloin alkioiden tulisi olla kehitysasteeltaan moruloita tai blastokystejä. Superovuloidun lehmän siirtokelpoisten alkioiden kehitysasteissa saattaa olla huomattavia eroja vaihdellen morulasta kuoriutuneisiin blastokysteihin huuhtelupäivänä seitsemän päivän kuluttua ensimmäisestä huuhtelusiemennyksestä. Samaan aikaan siirtokelpoisten alkioiden laatu saattaa vaihdella erinomaisesta kehoon. (Bó ja Mapletoft 2013.)

Alkion kehitysasteen lisäksi luokitellaan alkion laatu (taulukko 5). Siirtokelpoiset alkiot voidaan joko pakastaa tai siirtää vastaanottajalehmään tuoreeltaan. Tuoresiirroissa voidaan käyttää luokkien I, II tai III alkiota, pakastukseen kelpaavat yleensä vain I-luokan alkiot. IV-luokan alkiot ovat hedelmöittymättömiä munasoluja tai surkastuneita alkiota, jotka ovat jakautuneet muutamia kertoja ja sitten kuolleet, eikä niitä käytetä alkionsiirrossa ollenkaan. (Aro ym. 2012, 153.)



KUVA 4. Muodoltaan normaaleja naudan alkioita eri kehitysvaiheissa (Troxel s.a).

Alkion laatuluokka vaikuttaa alkion kykyyn tiineyttää vastaanottaja. Parhaiten vastaanottajat tiinehtyvät I-luokan tuorealkioista, joiden tiineyttämisprosentti on 55–60. II-luokan tuorealkiot tiinehtyvät 50–55 prosenttia vastaanottajista ja III-luokan tuorealkiot alle 50 prosenttia vastaanottajista. Pakas- tealkioiden tiineyttämisprosentti on noin 50.

TAULUKKO 5. Alkioiden laatuluokat IETS:in mukaan (IETS 2016).

Luokka	Kuvaus
I	<b>Erinomainen tai hyvä.</b> Symmetrinen ja pallomainen alkiomassa, jossa toisistaan selkeästi erottuvat, jakautuneet solut. Solut ovat kooltaan, väriltään ja tiheydeltään yhtenäisiä. Solumassasta 85 % on koskematon ja elinkelpoista massaa. Zona pellucidassa eli munasolun ketossa ei ole koveria tai litteitä kohtia, jotka saattaisivat aiheuttaa alkion tarttumisen petrimaljaan tai olkeen.
II	<b>Kohtalainen.</b> Kohtalaista epätasaisuutta solumassan koossa, värissä tai solujen tiheydessä. Vähintään 50 % solumassasta elinkykyistä.
III	<b>Kehno.</b> Huomattavia epätasaisuuksia solumateriaalin värissä, koossa tai tiheydessä. Vähintään 25 % solumassasta elinkykyistä.
IV	<b>Kuollut tai degeneroitunut.</b> Elinkyvytön alkio.

### 3.3.2 Tuore- ja pakastealkiot

Tuorealkioiden elinkelpoisuuden säilyvyydestä on useita mielipiteitä. Mapletoftin (2006) mukaan tuorealkioita voidaan säilyttää useita tunteja huonelämpötilassa huuhtelunesteessä. Hänen mukaansa tuorealkiot on myös mahdollista jäähdyttää ja niitä voidaan säilyttää elinkelpoisina jääkapissa 2–3 vuorokauden ajan. Tätä myöhemmin käytettäväksi tarkoitetut alkiot on syytä pakastaa. Laatuluokaltaan huonommat, II ja III -luokkaiset alkiot onnistuvat usein tiineyttämään vastaanottajaeläimen, mutta ne eivät kestä pakastusta. (Mapletoft 2006.)

Usein alkiot pakastetaan ja säilötään nestetyypeen. Alkioiden kuljettaminen pakastettuina helpottaa kansainvälistä eläinkauppaa, sillä elävien eläinten maahantuominen olisi monella tavalla hankalampaa ja riskialttiimpaa alkioiden maahantuomiseen verrattuna. Alkion laatuluokan lisäksi myös kehitysvaihe vaikuttaa alkion kylmänkestävyyteen. Siitä, mikä kehitysaste takaa parhaan kylmänkestävyyden, on useita ristiriitaisia tutkimustuloksia. Erään tutkimuksen mukaan pakastusta parhaiten todetaan kestävän blastokystivaiheen alkioiden, kun taas toinen tutkimus sanoo moruloiden ja varhaisen blastokystien kestävän pakastuksen blastokystejä ja laajentuneita blastokystejä paremmin. (Heikkilä 2015, 8.)

Kun alkiot pakastetaan, ne tulee jäähdyttää riittävän hitaasti. Lämpötila saa laskea korkeintaan 1 °C minuutissa. Toisaalta liian hidas jäähdytysnopeus saattaa aiheuttaa soluvaurioita alkioiden sulatus tapahtuu pitämällä alkio-olkea typpisäiliöstä ottamisen jälkeen ensin 10–15 sekunnin ajan ilmassa, jonka jälkeen olki upotetaan lämpötilaltaan 20–35 °C vesihauteeseen 7–10 sekunnin ajaksi. Yleisesti kaupallisesti alkionsiirtoa harjoittavilla yrityksillä on omat käytänteensä alkioiden sulattamiseen. (Heikkilä 2015, 8–9.)

### 3.4 Alkionsiirron etuja

Alkionsiirron avulla jalostusarvoltaan hyvälle lehmälle voidaan saada jälkeläisiä moninkertainen lukumäärä verrattuna siihen, kuinka paljon lehmä tavallisesti pystyisi elinaikanaan lisääntymään. Lehmän tuottaessa keskimäärin 2–3 jälkeläistä, tämä lukumäärä jälkeläisiä saadaan jo yhdestä alkiohuuhtelusta sitä seuraavien, onnistuneiden alkionsiirtojen myötä. Toisekseen lehmälle saadaan alkionsiirron avulla jälkeläisiä paljon nopeammin kuin perinteisin menetelmin. (Juga ym. 1999, 215; Nokka 2016.)

Kansainvälistä eläinkauppaa käydään nykyään usein juuri alkioin, sillä eläintaudeilla on erittäin pieni riski siirtyä alkioiden välityksellä. On tehty useita kokeita, joissa alkioita on siirretty taudin saastuttamasta karjasta terveeseen karjaan ilman, että tauti olisi siirtynyt mukana. Sen ansiosta erillistä karanteenia ei tuonnin takia tarvita. Yleisempien tartuntatautien aiheuttajat eivät tavallisesti suuntaudu munasarjoihin tai kohdun onteloon. (Juga ym. 1999, 215.)

Alkion muita etuja ovat esimerkiksi sen pieni koko, joka on eduksi pitkällä kuljetusmatkoilla, kun yhteen nestetyypissäiliöön mahtuu tuhansia pakastettuja alkioita. Mannertenvälinen eläinten kuljetus on kallista. Elävinä kuljetettuihin eläimiin verrattuna alkioista syntyneellä vasikalla on myös se etu, että

ternimaito tulee emästä ja vasta-aineet kehittyvät emän elinympäristöä vastaan. Vasikka saa siten ternimaidossa oikeanlaisia vasta-aineita omaa elinympäristöään ajatellen. (Aro ym. 2012, 159; Juga ym. 1999, 216; Mapletoft 2013, 170.)

Katoavia rotuja ja tyyppjä voidaan myös säilyttää elävien eläinten ja pakastesiemenen lisäksi pakastealkioina lähes ikuisesti. Pakastetun eläinaineksen geneettinen rakenne ei muutu vuosien aikana, kun puolestaan pienissä säilytyskarjoissa tapahtuu väkisin sattuman aiheuttamaa geneettistä ajautumista. Alkioiden pakastaminen ja tuottaminen tähän tarkoitukseen on kalliimpaa kuin siemennesteen pakastaminen, mutta mikäli rotu on kuollut sukupuuttoon, ei pelkästä siemennesteestä saada puhdasrotuisia eläimiä. (Aro ym. 2012, 160; Juga ym. 1999, 216.)

### 3.5 Alkionsiirron haasteita

Alkionsiirtoon liittyy myös joitakin haasteita ja riskejä, joiden vuoksi alkionsiirtoa ei välttämättä tilalla haluta tehdä sen jalostuksellisista hyödyistä huolimatta. Kaikkiaan 10–15 prosenttia alkiohuuhteluista on sellaisia, ettei niistä saada siirtokelpoisia alkioita onnistuneista toimenpiteistä ja hoidosta huolimatta lainkaan. Huomionarvoista on myös eläimen hyvinvointi, mikäli alkioiden kerääminen jatkuu pitkään. Alkionsiirron ympärillä veloo usein myös keskustelu sen eettisyydestä. (Lindeberg 2017; Vartia s.a.)

Mikäli alkionsiirto tai -huuhtelu epäonnistuu teknisesti, naaras voi huonoimmassa tapauksessa jäädä steriiliksi. Tätä ei haluta aiheuttaa etenkin luovuttajalle, jolla on käytännössä aina keskimääräistä parempi jalostuksellinen arvo. Toisekseen niin luovuttajaeläimelle kuin vastaanottajalle joudutaan tekemään tarkkaohjelmainen hormonikäsittely, joka aiheuttaa kustannuksia ja vaivannäköä tilallisille. Myös varsinainen alkiohuuhtelu ja alkionsiirto ovat kustannuksia aiheuttavia toimenpiteitä. (Sirkkola ja Tauriainen 2013, 133.)

Riski tautien siirtymiseen alkioiden välityksellä on äärimmäisen pieni, mutta mahdollinen. Taudinaiheuttajista alkioiden välityksellä on pyritty pääsemään eroon testaamalla luovuttajaeläin ennen ja jälkeen alkioiden huuhtelua, käsittelemällä alkioita huolellisesti huuhtelun jälkeen tai nämä keinot yhdistämällä. Alkionsiirron yhteydessä mahdollisesti leviävät taudit on jaettu neljään kategoriaan IETS:in toimesta. Kategoriaan 1 (mitätön riski) kuuluvat esimerkiksi sinikielitauti, BSE, bruselloosi, suu- ja sorkkatauti, entsoottinen leukoosi ja IBR. Päivitetty lista alkionsiirron välityksellä mahdollisesti leviävistä taudeista löytyy kategorioittain OIE:n sivuilta (World Organisation for Animal Health). Suomen hyvän tautitilanteen vuoksi riski eläintautien siirtymiseen luovuttajaeläimestä alkionsiirron yhteydessä vastaanottajaan on mahdollisimman pieni. (Givens, Gard ja Stringfellow 2007; Lindeberg 2017.)



## 4 TUTKIMUSMENETELMÄ

Opinnäytetyössä raportoidun tutkimuksen tavoitteina olivat nykyisin käytössä olevan naudan alkiohuuhtelun superovulaatiokäsittelyohjelman parantaminen ja tuorealkioiden viileäkuljetuksen kehittäminen. Uutta superovulaatiokäsittelyohjelmaa tutki erikoistutkija Heli Lindeberg Luonnonvarakeskus Luke Maaningan tutkimuspihatossa (Cowlab™). Hänen tutkimuksensa oli nimeltään ”Hitaasti follikkelia stimuloivaa hormonia (FSH) vapauttavan kantaja-aineen käyttö naudan alkiohuuhtelun superovulaatiokäsittelyssä”. Lindeberg toimi itse vastaavana tutkijana ja käytti avustajaa tarvittaessa eri toimenpiteissä. Hänen oli ilmoitettava tutkimuksesta Fimeaan, sillä lääkelaki velvoittaa, että eläinlääkkeillä tehtävistä kliinisistä tutkimuksista on tehtävä ennakoilmoitus Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskuslääkärille: ”Tutkimuksen toimeksiantajan tai sen edustajan on toimitettava ennakoilmoitus Fimeaan postitse ja paperisena vähintään 60 vrk ennen aiottua tutkimuksen aloitusajankohdtaa.” (Fimea s.a; Lindeberg s.a; lääkelaki 16.10.2009/773.)

Nykyinen, yleisesti maailmalla käytetty superovulaatiokäsittelyohjelma on kahdeksan eri hormonipistoksen vuoksi työläs ja aikaa vievä prosessi tilalliselle. Tutkimussuunnitelmassa todetaan, että mikäli tutkittava kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma tuottaisi alkioita yhtä hyvin kuin nykyisin yleisesti käytössä oleva ohjelma, se tulisi mahdollisesti lisäämään lypsykarjatilojen suostuvaisuutta alkiohuuhtelun käyttämiseen ja näin naaraspuolisten eläinten jalostus nopeutuisi. Lisäksi uusi kevyempi käsittely olisi kustannus- ja resurssitehokkaampi, vähentäisi eläimen tuntemaa epämukavuutta ja kipua sekä olisi yksinkertainen. (Lindeberg s.a.)

Tutkimuksessa verrattiin alkiosaantoa uuden, tutkittavan superovulaatiokäsittelyohjelman ja nykyisin käytössä olevan välillä. Tutkimuksen tarkoituksena oli testata Suomessa yleisesti käytetyn superovulaatiohormonivalmisteen (Pluset) tehoa tuottaa alkioita, kun pistokohdan lihaksessa on samanaikaisesti hormonin kanssa natriumhyaluronaattia (Hyonate). Natriumhyaluronaatin tarkoituksena oli hidastaa hormonin imeytymistä pistoskohdasta, jolloin hormonin pistoskertoja voitiin vähentää kahdeksasta kahteen. Tutkimuksen nollahypoteesi oli ”Superovulaatiokäsittelyohjelmien alkiontuottokyvyn välillä ei ole eroja.” Tutkimuskysymyksiä tässä tutkimuksessa olivat seuraavat:

- Kuinka monta siirtokelpoista alkioita superovulaatiokäsittelyohjelmat tuottavat keskimäärin per huuhtelu?
  - Poikkeako alkiosaanto kahden ja kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmien välillä?
  - Poikkeako tuotettujen siirtokelpoisten alkioiden laatu ja kehitysaste kahden ja kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmien välillä?
  - Korreloiko Anti-Müllerian-hormonipitoisuus positiivisesti siirtokelpoisten alkioiden lukumäärään?
- (Lindeberg s.a.)

Tutkittavista eläimistä kerättiin plasmaverinäytteet ennen superovulaatiokäsittelyohjelman aloittamista. Näytteistä määritettiin Anti-Müllerian -hormonipitoisuus (AMH), jonka on tutkimuksissa raportoitu olevan erittäin hyvä alkioituotannon merkkiaine. Aiemmissä tutkimuksissa on todettu, että ennen superovulaatiohormonikäsittelyä mitattu plasman AMH-pitoisuus vaihtelee eläinten välillä ja korreloi positiivisesti ovulaatioiden lukumäärään ja tuotettujen siirtokelpoisten alkioiden lukumäärään

munasarjan hormonikäsittelyn jälkeen. Tutkimuksissa on myös todettu, että kunkin eläimen AMH-pitoisuus voi pysyä tasaisena usean kuukauden ajan. Lisäksi munasarjan hormonistimulaation jälkeen tuotettujen alkoiden lukumäärällä on erittäin hyvä toistettavuus ja suhteellisen hyvä periytyvyys. Siksi plasman AMH-pitoisuuden määrittäminen mahdolliselta luovuttajalehmältä ennustaa hyvin sekä lehmän munasarjatoiminnan tasoa että lehmän kykyä tuottaa paljon (korkea AMH-pitoisuus) tai vähän alkioita (alhainen AMH-pitoisuus). (Lindeberg s.a. Monniaux ym. 2010.)

Alkuperäisessä tutkimussuunnitelmassa tuotettujen alkoiden jatkokäyttöä ei ollut määritelty. *In vivo*-tuotetut tuorealkiot ovat tutkimuskäytössä arvostettuja ja harvinaisia koeputkialkioihin verrattuna, joten kokeessa tuotettujen huuhtelualkoiden jatkotutkimuksista sovittiin Luonnonvarakeskus Jokioisten toimipisteen kanssa. Lindeberg ja Jokioisten toimipisteessä työskentelevät alkioitutkijat Jaana Peippo ja Mervi Mutikainen päättivät, että kokeessa tuotettujen huuhtelualkoiden avulla tutkittaisiin, kuinka ne kestävät viileäkuljetusta. Viileäkuljetukseen tarvittavat kuljetuslaatikot saatiin lainaan Viking Geneticsiltä, jossa tuorealkoiden viileäkuljetusta oli testattu vuoden 2016 aikana ja saatu hyviä tuloksia niin, että tuorealkoiden viileäkuljetukset maakuntiin oli jo aloitettu. Tarvetta oli kuitenkin vielä testata erilaisia säilytysliuoksia ja viileässä säilyttämisen ajallista kestoa. Viking Geneticsin yhteyshenkilönä toimi alkionsiirtoeläinlääkäri Marja Mikkola. Nollahypoteesi tässä jatkotutkimuksessa oli ”alkoiden edelleen kehittymiskyky ei heikkene vuorokauden kuljetuksen aikana”. Tutkimuskysymyksiä olivat seuraavat:

- Kuinka suuri osa huuhtelualkioista kestää viileäkuljetusta?
- Miten pitkän viileäsäilytyksen huuhtelualkiot kestävät?
- Vaikuttaako huuhtelualkoiden säilytysliuos alkoiden viileäsäilytyksen kestävyteen? (Lindeberg s.a.)

Tämän opinnäytetyön tutkimuksissa on käytetty kvantitatiivisen tutkimuksen kokeellista eli eksperimentaalista tiedonkeruumenetelmää. Kokeellisessa tutkimuksessa pyritään tutkimaan ainoastaan yhden tai useamman tutkitun muuttujan vaikutusta muut tekijät vakioimalla. Tutkimuksessa verrattiin kahden eri superovulaatiokäsittelyohjelman kykyä tuottaa alkioita, jolloin superovulaatiokäsittelyohjelma on tutkimuksen riippumaton muuttuja ja huuhdeltujen alkoiden lukumäärä riippuva muuttuja. Muut tekijät vakioitiin toteuttamalla molemmat käsittelyt kaikille tutkittaville eläimille. (Heikkilä 2014, 19; Lindeberg s.a. Taanila 2014.)

#### 4.1 Koeasetelma

Tutkimuksen koeasetelma noudattaa latinalaisen neliön mallia (kuvio 4). Sillä pystytään poistamaan lehmien välinen vaihtelu hormonihoitovasteessa. Latinalaisessa neliössä vertailtavia käsittelyjä, rivi-tekijän luokkia ja saraketekijän luokkia on oltava yhtä monta. Tässä tutkimuksessa niitä kaikkia oli kaksi. (Ranta, Rita ja Kouki 2012, 267–268.)

	<b>Nykyinen superovulaatio- käsittelyohjelma</b>	<b>Tutkittava superovulaatio- käsittelyohjelma</b>
<b>1. huuhtelukierros</b>	A	B
<b>2. huuhtelukierros</b>	B	A

KUVIO 4. Tutkimuksen koeasetelma

Tässä tutkimuksessa otosta ei voitu valita satunnaisesti, vaan tutkimukseen valittiin saatavilla oleva ryhmä, joka jaettiin kahteen koeryhmään (ryhmä A ja ryhmä B) arpomalla. Molemmat käsittelyt haluttiin toteuttaa kaikille tutkituille lehmille, sillä lehmät reagoivat yksilöllisesti superovulaatiohormonikäsittelyyn – toiset tuottavat samalla käsittelyllä kymmeniä alkioita, toiset vain muutamia. Mikäli tätä ei olisi huomioitu, tutkimuksen tulos olisi saattanut vääristyä huomattavasti. Lisäksi niin ensimmäisellä kuin toisella huuhtelukierroksella toteutettiin molempia superovulaatiokäsittelyohjelmia yhtä aikaa. (Lindeberg s.a; Ranta ym. 2012, 267–268.)

#### 4.2 Aineiston keruu

Tutkimukseen valittiin 12 Luke Maaningan tutkimuspihaton lisääntymiselimiltään tervettä lypsylehmää. Lehmistä kahdella oli entuudestaan jalkavaivoja. Lehmät olivat iältään 3–9 -vuotiaita ja poikineet 1–4 kertaa. Tutkimussuunnitelman mukaan lehmien tuli olla vähintään yli kaksi kuukautta ennen kokeen alkua poikineita ja lisääntymiselimiltään normaaleja. Lehmien kiimakiertoa seurattiin tutkimalla kohtua ja munasarjoja käsin tunnustelemalla peräsuolen kautta ja ultraäänilaitteen avulla jo ennen kokeen alkua, jolloin lehmien lisääntymiselinten tila tunnettiin mahdollisimman hyvin. Tutkimukseen ei otettu mukaan lehmiä, joilla oli kohdun limakalvon tulehduksen oireita, toimimattomat munasarjat tai jotka olivat palautuneet muutoin hitaasti poikimisesta. (Lindeberg s.a.)

Tutkimussuunnitelman mukaan tutkimuksen aikana sairastuneet lehmät poistettiin kokeesta ja niiden tilalle oli tarkoitus ottaa korvaava lehmä. Kokeeseen otettiin 12 lypsylehmää, jotta tutkimus- ja kontrolliryhmissä (n = 6 molemmissa ryhmissä) olisi ollut riittävästi lehmiä tuottamaan vähintään 60 siirtokelpoista alkioita ryhmää kohti. Tavoitteena oli huuhdella keskimäärin 6-7 siirtokelpoista alkioita huuhtelua kohden. (Lindeberg s.a.)

Lehmien superovulaatiokäsittelyohjelmat kirjattiin opinnäytetyön liitteen yksi mukaiseen alkiohuuhtelukaavakkeeseen, jonka mukainen kaavake on yleisesti alkiohuuhtelutoimijoilla käytössä Suomessa. Jokaista lehmää kohti huuhtelukaavakkeita täytettiin kaksi, yksi ensimmäisellä huuhtelukierroksella ja toinen toisella kierroksella. Kaavakkeeseen pyrittiin täyttämään tiedot lehmille tehdyistä tarkastuksista ja annetuista hoidoista mahdollisimman tarkasti ja selkeästi. Siihen kirjattiin tilan nimi, lehmän nimi ja korvanumero, edellinen poikimapäivämäärä, huuhteluohjelman aloituskäynnin päivämäärä, annetut hormonipistokset ja huuhtelusiemennykset päivämäärineen ja kellonaikoinen, alkiohuuhtelun päivämäärä ja huuhtelun jälkeinen hormonihoido. Lisäksi kaavakkeeseen kirjattiin kun-

kin huuhtelun alkiosaanto ja mahdolliset muut tutkimuksen aikana lehmälle tehdyt ultraäänitutkimukset ja hoidot.

Alkiohuuhteluiden tulokset kirjattiin Excel-tiedostoon, jossa jokaiselle huuhtelulle oli oma taulukko. Ylös kirjattiin huuhtelukierros (1. tai 2.), ryhmä (A tai B), huuhtelun päivämäärä, huuhdellun lehmän nimi ja korvanumero sekä siirtokelpoisten alkioiden lukumäärä ja laatuluokka, surkastuneiden alkioiden ja hedelmöittymättömien munasolujen lukumäärä. Kun siirtokelpoiset alkiot saatiin luokiteltua, ne pakattiin olkiin viileäkuljetusta varten. Viileäkuljetusta varten Excel-tilukkaan kirjattiin oljen järjestysnumero ja oljen sisältämät alkiot sekä alkioiden käsittelyyn käytetty liuos. Lisätietoihin kirjattiin alkioiden olkiin pakkaamisen sekä olkien kylmiöön laittamisen kellonajat. Muistiin kirjattiin myös muita mahdollisia huuhteluun ja alkioiden mikroskopointiin liittyviä huomioita. Maaningalla tehdyt kirjaukset on merkitty liitteeseen punaisella värillä (liite 2). Myös tulokset alkioiden viileäsäilytyksen kestävydestä kirjattiin Jokioisten toimipisteessä samaan taulukkaan (liitteessä 2 sinisellä merkityt).

Alkuvuosi 2016	Tutkimuksen suunnittelu Rahoituksen myöntöpäätös Olvin Säätiöltä Eläinkoelupa ELLAsta Tarvikkeiden hankinta
Kesäkuu 2016	Fimea hyväksyy tutkimuksen toteuttamisen
Heinäkuu 2016	Tutkimuseläinten seuranta Aloituskiiimojen synkronointi
Elokuu 2016	1. kierros: AMH-verinäytteiden ottaminen aloituskiimassa, superovulaatiokäsittelyt, huuhtelusiemennykset ja alkiohuuhtelut, emätinkierukoiden asennus 10 vuorokaudeksi 2. kierroksen aloituskiimojen yhdenaikaistamiseksi, alkioiden lähettäminen viileäkuljetuksessa Jokioisiin
Syyskuu 2016	2. kierros: AMH-verinäytteiden ottaminen aloituskiimassa, superovulaatiokäsittelyt, huuhtelusiemennykset ja alkiohuuhtelut, alkioiden lähettäminen viileäkuljetuksessa Jokioisiin, alkiohuuhtelun jälkeinen hormonikäsittely
Loka-marraskuu 2016	2. huuhtelukierrokselta poisjääneiden lehmien huuhtelut, jonka jälkeen alkiot Jokioisiin
Helmi-toukokuu 2017	AMH-näytteiden lähettäminen tutkittaviksi, näytteiden tulokset toukokuussa 2017

KUVIO 5. Aikajana tutkimuksen toteutuksesta

Tutkimuksessa mukana olleet lehmät ruokittiin kokeen aikana normaaliin tapaan tuotostasonsa ja -vaiheensa mukaisesti sekä lypsettiin kaksi kertaa päivässä muun karjan mukana. Lehmien lypsy alkoi aamulla klo 06 ja iltapäivällä klo 15 ja kesti noin 3 tuntia kerrallaan. Ennen tutkimuksen alkamista

lehmät sijoitettiin pihatossa samalle osastolle, jotta niiden liikuttelu kokeen aikana karsinaan ja parteen hoitotoimenpiteitä varten helpottui. Tutkimusta valmisteltiin jo alkuvuonna 2016, mutta varsinainen toteutusvaihe sijoittui ajalle 1.7.–31.11.2016 (kuvio 5). Ainoastaan veriplasmanäytteiden lähettäminen tutkittaviksi ja niiden tulokset jäivät vuodelle 2017.

#### 4.2.1 Alkiohuuhteluiden toteutus ja alkioiden käsittely

Kokeeseen osallistuneiden lehmien kiimakierrot yhdenaikaistettiin prostaglandiinipistoksen avulla. Pistoksen ansiosta lehmät tulivat huuhteluohjelman aloituskiimaan 2–5 päivän sisällä pistoksesta. Näin saatiin kokeessa olevista 12 lehmästä muodostettua kolme neljän lehmän ryhmää. Kun kolme neljän lehmän ryhmää oli selvillä, arvottiin kustakin neljän lehmän ryhmästä kaksi lehmää, joille tehtiin normaali superovulaatiokäsittely ja kahdelle jäljellejääneelle lehmälle tehtiin uusi, tutkittava käsittely. Superovulaatiohormonikäsittelyt aloitettiin 9–12. päivänä aloituskiiman (=päivä 0) jälkeen siten, että yksi neljän lehmän ryhmä oli superovulaatiokäsittelyssä samanaikaisesti ja tämä neljän lehmän ryhmä huuhtelusiemennettiin yhtenä ryhmänä ja alkiohuuhdeltiin samana päivänä. Näin saatiin kolme eri alkiohuuhtelukertaa kummallekin huuhtelukierrokselle.

Kun tutkittavalle lehmälle tehtiin kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma, sille annettiin pistoksena etulavan lihakseen ohjelman ensimmäisenä päivänä 9,5 millilitraa superovulaatiohormonivalmistetta (Pluset vet, Laboratorios Calier, S.A., Espanja) ja heti sen jälkeen natriumhyaluronaativalmistetta (Hyonate® vet 10 mg/ml, Bayer Animal Health GmbH, Saksa) 4,5 millilitraa samasta pistokohdasta. Superovulaatiokäsittelyohjelman kolmantena päivänä lehmälle annettiin jälleen pistoksena etulavan lihakseen Pluset-valmistetta 4,5 millilitraa ja Hyonate-valmistetta 2,2 millilitraa, molemmat samaan kohtaan. Ensimmäisellä pistokerralla lehmä sai kaksi kolmasosaa kokonaisannoksesta (667 IU) ja toisella pistokerralla yhden kolmasosan (333 IU).

Kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma toteutettiin siten, että lehmälle annettiin pistoksena etulavan lihakseen jokaisena ohjelman neljänä päivänä ainoastaan Pluset-valmistetta. Lääkeannos pieneni ohjelman edetessä siten, että ensimmäisenä päivänä lehmälle annettiin pistoksena etulavan lihakseen valmistetta yhteensä 7 millilitraa, toisena 5 millilitraa, kolmantena 4 millilitraa ja neljäntenä 3 millilitraa. Päiväannos annettiin kahtena yhtä suurena annoksena aamuin illoin noin 12 tunnin välein. Hormonin kokonaisannos oli 1000 IU.

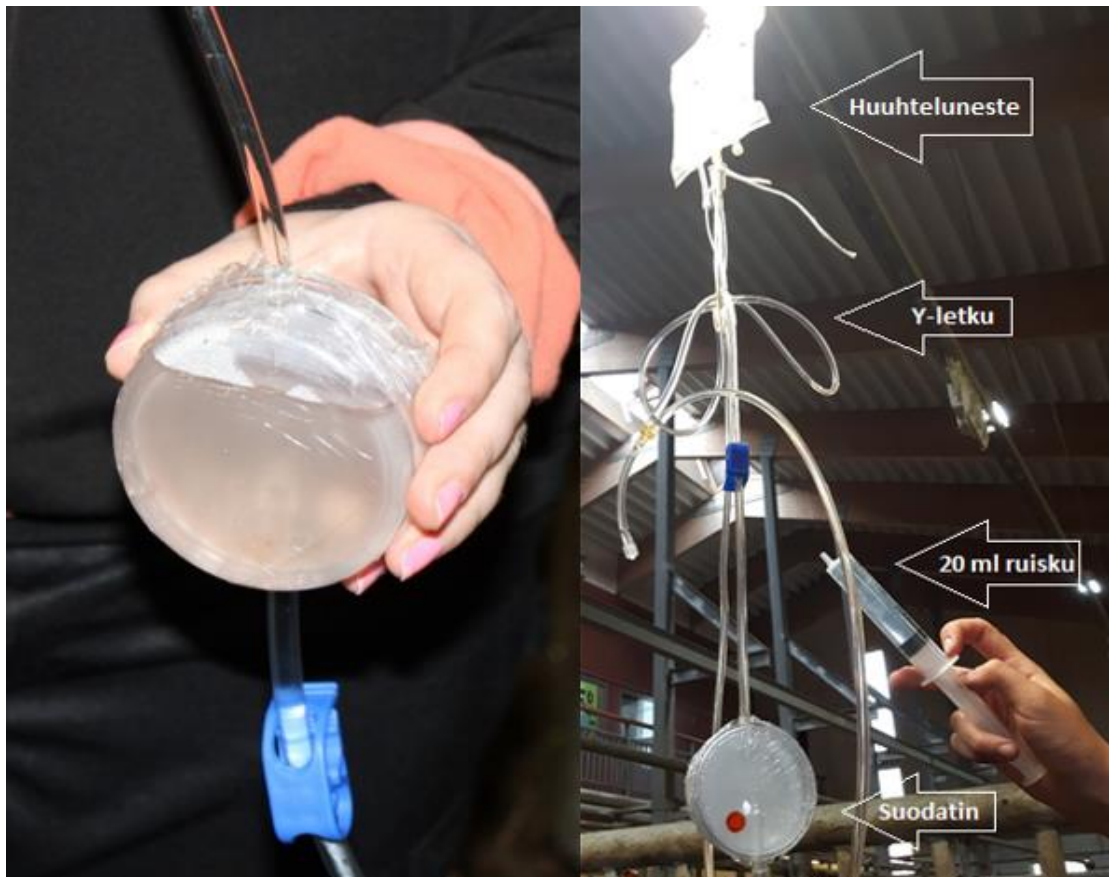
Kummankin superovulaatiokäsittelyn kolmannen ja neljännen päivän iltana lehmälle annettiin prostaglandiinipistos. Pistosten ansiosta lehmät tulivat kiimaan huuhtelusiemennyksiä varten. Lehmien ensimmäinen kolmesta huuhtelusiemennyksestä tehtiin 12 tuntia seisovan kiiman alusta ja seuraavat kaksi huuhtelusiemennystä 12 tunnin välein. Kaksi lehmistä huuhtelusiemennettiin toisella huuhtelukierroksella neljä kertaa, koska niiden kiima jatkui muita pidempään. Lehmät alkiohuuhdeltiin seitsemäntenä päivänä ensimmäisestä huuhtelusiemennyksestä, jotta alkiot olisivat olleet noin viikon ikäisiä huuhdeltaessa. Yhdellä alkiohuuhtelukerralla huuhdeltavat alkiot olivat kahdeksan päivän ikäisiä (päivä seitsemän oli viikonloppuna).

Huuhtelupäivänä kaikki tarvittavat välineet (liite 3) asetettiin puhdistetulle ja desinfioidulle pöydälle. Pöydän valmisteluun ja tavaroiden asettamiseen pöydälle kului aikaa noin puoli tuntia. Lehmän valmistelu alkiohuuhteluun aloitettiin epiduraalipuudutuksella. Pistoskohdasta ajeltiin karvat leikkuuveitsen terällä (kuva 5), jonka jälkeen ihoa puhdistettiin useaan kertaan 70 prosenttisella alkoholilla. Oikea pistoskohta etsittiin liikuttamalla lehmän häntää lyhyin liikkein ylös ja alas, jolloin samanaikaisesti sormella tunnustelemalla etsittiin kahdesta joko ristiluun ja 1. häntänikaman tai 1. ja 2. häntänikaman välisestä nikamavälisestä avonaisemmalta tuntuva väli, josta puudute voitiin pistää selkäydinkanavaan. Puudutetta (Procamidor vet. 20 mg/ml, Richter Pharma AG, Wels, Itävalta) annosteltiin kullekin lehmälle 5 ml ja sitä lisättiin tarvittaessa huuhtelun edetessä 2–3 ml. Epiduraalipuudutuksen ansiosta peräsuolen supistelu väheni merkittävästi, mikä helpotti alkiohuuhtelun tekemistä. Lisäksi lehmän häntä rentoutui ja se saatiin helposti sidottua sivuun huuhtelun ajaksi.



KUVA 5. Lehmille annettiin epiduraalipuudutus ennen huuhtelua (Kukkonen 2016-08-22).

Ennen alkiohuuhtelun aloittamista avustaja ripusti noin 40–42 asteisessa vesihauteessa lämmitetyn huuhtelunestepussin (Vigro Complete Flush, Bioniche Animal Health USA Inc., Yhdysvallat) roikkumaan lehmän yläpuolelle. Pussiin kiinnitettiin Y-letku, johon edelleen kiinnitettiin suodatin (kuva 6). Seuraavaksi avustaja huuhteli katetrin ruiskuttamalla sen läpi 20 millilitraa huuhtelunestettä, jolla testattiin, että katetri varmasti toimi eikä sen sisään ollut valmistuksessa jäänyt muovinkappaleita, joiden ei haluttu päätyvän lehmän kohtuun. Katetrin sisään pujotettiin 70 prosenttisella alkoholilla puhdistettu ja geelillä liukastettu jäykistin (kuva 7), jonka jälkeen katetri asetettiin puhtaan pitkän tutkimuskäsineen sisäpuolelle pöydälle odottamaan. Tällä välin alkio huuhteleva eläinlääkäri tyhjensi lehmän peräsuolen ulosteesta. Avustajan tehtävänä oli tämän jälkeen puhdistaa lehmän hävyn seutu mahdollisimman hyvin 70 prosenttisella alkoholilla ja pyyhintälapuilla, jotta alkiohuuhtelu voitaisiin toteuttaa mahdollisimman hygieenisesti.



KUVA 6. Huuhtelunesteellä täytetty suodatin (alkiohuuhtelun jälkeen) ja alkiohuuhtelun tarvikkeita (Kukkonen 2016-08-22.)

Seuraavaksi jäykistimen avulla jäykistetty katetri vietiin lehmän emättimeen ja pujotettiin kohdunkaulan läpi mahdollisimman pitkälle jompaankumpaan kohdunsarveen. Tämän jälkeen katetrin jäykistintä vedettiin hieman ulospäin ja samalla katetria työnnettiin eteenpäin niin, että se pääsi kääntymään alaspäin ja työntyä vielä pidemmälle kohdunsarveen (kuva 2). Seuraavaksi avustaja alkoi täyttää 20 millilitran ruiskun avulla katetrin ilmamansettia, johon ilmaa ruiskutettiin noin 16–20 millilitraa. Täytetty ilmamansetti piti huuhtelukatetrin paikoillaan kohdunsarvessa. Tämän jälkeen Y-letku kiinnitettiin katetriin ja varsinainen alkiohuuhtelu aloitettiin.



KUVA 7. Jäykistimen pujoitus huuhtelukatetrin sisään (Kukkonen, 2016-10-04).

Kohdunsarvi täytettiin huuhtelunesteellä ja täyttynyttä kohdunsarvea nosteltiin, jotta alkio irtoaisivat limakalvolta nesteeseen. Sitten neste laskettiin pois kohdunsarvesta Y-letkua pitkin suodattimeen, joka pidatti alkioita, mutta päästi nesteen lattialle. Kohdunsarvi täytettiin huuhtelunesteellä noin 6–7 kertaa ja molemmat kohdunsarvet huuhdeltiin vuoron perään. Huuhtelunestettä käytettiin 1–2 litraa jokaista lehmää kohti ja kulutus vaihteli sen mukaan, kuinka suuret kunkin lehmän kohdunsarvet olivat ja kuinka pitkälle kohdunsarveen ilmapansetti saatiin asetettua (mitä pidemmälle, sitä vähemmän huuhtelunestettä kului kohdunsarven täyttämässä). Mikäli lehmän peräsuoleen kertyi ilmaa toimenpiteen aikana, sitä pumpattiin pois ilmapatjan pumpulla asettamalla pumppu vetämään ilmaa pois. Viimeisen huuhtelukerran jälkeen suodatin täytettiin huuhtelunesteellä sulkemalla suodattimen ulostuloletku sulkimella ja täyttämällä suodatin huuhtelupussin nesteellä. Tämä helpotti alkioiden jatkokäsittelyä, koska näin menetellen suodatinosaan tarttunut lima oli helpompi huuhdella irti suodattimesta.

Huuhteluiden jälkeen navetasta siirryttiin erilliseen, puhtaaseen tilaan alkioiden mikroskopointia varten. Kaikki alkioita ja hedelmöitymättömät munasolut sekä mahdolliset tyhjät munasolun ketot eli zona pellucida etsittiin stereomikroskoopin avulla huuhtelumatjalta ja petrimaljoilta, joille huuhtelumatjan suodatin oli huuhdeltu huuhtelunesteellä 20 ml:n ruiskua ja ohutta 23 G:n sinistä neulaa apuna käyttäen. Kukin alkio siirrettiin huuhtelu- tai petrimaljalta heti löytämisen jälkeen pienellä sormipipetillä pikkumatjalle (halkaisija 3 cm), jossa oli 3–4 ml Holding -liuosta (Syngro® Holding, Bioniche Animal Health USA Inc., Yhdysvallat). Tällä maljalla alkioita odottivat, kunnes ne jatkokäsitteliin olkiin pakkaamista varten. Odotusaika vaihteli kahdesta tunnista seitsemään tuntiin.

Huuhtelu- ja petrimaljat etsittiin läpi useampia kertoja välillä pyöryttäen maljoilla olevaa nestettä ja hetken laskeutumisen jälkeen etsittiin malja läpi uudelleen. Etsimisen helpottamiseksi petrimaljojen pohjaan oli tehty ruudukko vetämällä neulankärjellä ja viivoittimella ennen suodattimen huuhtelua. Huuhtelumatjan maljaosan pohjassa oli ruudukko jo valmiina. Alkioiden etsimisen päätyttyä pikku-



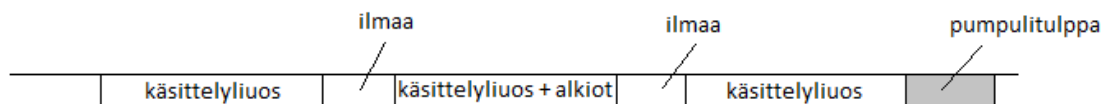
maljalla oleva etsintäsaalis arvosteltiin ja eroteltiin toisistaan siirtokelpoiset alkiot, surkastuneet alkiot sekä hedelmöittymättömät munasolut. Siirtokelpoisiksi alkioiksi luokiteltiin kehitysasteensa mukaan oikeassa vaiheessa olevat alkiot. Huuhtelupäivänä seitsemän alkion tuli olla kehitysasteeltaan morula tai blastokysti. Mikäli alkio oli tätä nuorempi, se luokiteltiin siirtokelvottomaksi, surkastuneeksi alkioiksi. Hedelmöittymättömät munasolut olivat yksisoluisia eivätkä olleet lähteneet jakautumaan, koska niiden sisään joko ei ollut tunkeutunut siittiötä tai vaikka siittiö olisi ne hedelmöittänytkin, ne eivät jostakin syystä olleet aktivoituneet jakautumaan. Surkastuneet alkiot, hedelmöittymättömät munasolut ja tyhjät zonat heitettiin roskeen sen jälkeen, kun niiden lukumäärät oli laskettu. Seuraavaksi kunkin kehitysasteen siirtokelpoiset alkiot luokiteltiin eri laatuluokkiin I, II ja III taulukossa 5 olevien kriteerien mukaisesti. Näin saatiin lukumäärät tietyn kehitysasteen ja laatuluokan alkioille. (Lindeberg, 2017.)

Siirtokelpoiset alkiot pakattiin olkiin viileäkuljetusta varten niin, että kunkin lehmän alkiot käsiteltiin omana ryhmänään. Alkiot, joilla oli sama kehitysaste ja laatuluokka, jaettiin mahdollisimman tasaisesti kahteen ryhmään. Toinen ryhmä pakattiin olkiin viileäkuljetusliuoksessa (H+FBS -liuos), jossa oli Holding -liuosta ja syntymättömän vasikan seerumia (FBS, *fetal bovine serum*, BCHRS0113, Biochrom Ltd., Englanti) suhteessa 1:1 ja toinen ryhmä pakattiin olkiin viileäkuljetusliuoksessa (H + SR -liuos), jossa oli Holding -liuosta ja Serum replacement (SR) -liuosta (Serum Replacement 1, S0638, Sigma-Aldrich Co., Yhdysvallat) suhteessa 1:1. Seerumia lisättiin viileäkuljetusliukseen, koska sen arveltiin parantavan alkioiden säilymistä elävänä kuljetuksen aikana. Holding (H) -liuos oli kaupallinen alkioiden käsittelyliuos, jota säilytettiin huoneenlämmössä. FBS -liuosta oli saatu Luke Jokioisista kokeessa tarvittava määrä koeputkissa, jotka säilytettiin -20 asteessa pakastimessa. SR-liuosta oli samoin saatu Luke Jokioisista 5 millilitran pullossa, jota säilytettiin +4 asteessa kylmiössä. Liuokset valmistettiin sen jälkeen, kun kaikki sinä päivänä huuhdellut alkiot oli löydetty ja arvosteltu ja tiedettiin, montako olkea tarvitsi tehdä. FBS-liuosputkellinen otettiin pakastimesta sulamaan ja SR-liuospullo kylmiöstä huoneenlämpöön noin 10 minuuttia ennen liuosten tekoa. Holding -liuosta säilytettiin huoneenlämmössä (Lindeberg 2017.)

Yhteen olkeen tarvittu nestetilavuus oli 0,25 ml ja alkioiden pesua varten tarvittiin 0,3 ml liuosta. Kumpikin liuos valmistettiin steriilin korkilliseen koeputkeen sekoittamalla 1:1 Holding -liuosta ja joko FBS - tai SR -liuosta ja sen jälkeen saatu liuos suodatettiin 0,2 mikrometrin suodattimella kaatamalla liuos koeputkesta 5 millilitran ruiskuun, jonka päähän suodatin oli kiinnitetty. Tämän jälkeen ruiskun männällä painettiin liuos suodattimen läpi uuteen steriiliin koeputkeen, joka seiso i koeputkelineessä. Tämän jälkeen liuos oli käyttövalmis. Liuosta pipetoitiin nelikuoppamaljalle kahteen kuoppaan. Toiseen kuoppaan pipetoitiin 0,3 millilitraa pesuliuokseksi ja toiseen kuoppaan noin 1 ml alkioiden olkiin pakkausliuokseksi. Kunkin lehmän saman kehitysasteen ja laatuluokan omaavista alkioista puolet (lukumäärä vaihteli 1 ja 7 alkion välillä) siirrettiin sormipipetillä nelikuoppamaljan ensimmäiseen kuoppaan. Ennen alkioiden imemistä tyhjään pipettiin oli vedetty nelikuoppamaljan ensimmäisestä kuopasta nestettä. Näin estetään pikkumaljalta, jolla alkiot olivat odottaneet olkiin pakkaamista, nelikuoppamaljalle siirtyvän Holding -liuoksen tilavuutta, kun alkioita pikkumaljalta pipettiin vedettäessä työnnettiin pipetissä olevaa nestettä maljalle alkion/alkioiden eteen ja heti sen jälkeen imettiin maljalla oleva alkio/olevat alkiot pipettiin. Alkion/alkioiden annettiin olla nelikuoppamaljan

ensimmäisessä kuopassa vain sen ajan, jonka kesti ottaa nelikuoppamaljan toisesta kuopasta uutta nestettä pipettiin. (Lindeberg 2017.)

Tämän jälkeen alkio/alkiot imettiin edellä kuvatulla tavalla ensimmäisestä kuopasta pipettiin ja siirrettiin toiseen kuoppaan. Toisesta kuopasta alkio/alkiot pakattiin olkeen yhdistämällä oljen pumpulitulppapää oljentäyttölaitteeseen ja asettamalla avoin pää nelikuoppamaljan toiseen kuoppaan nesteeseen alkio/alkioiden viereen ja aloittamalla imu. Olki täytettiin kuvan 8 mukaisesti. Ilman saamiseksi olkeen olki nostettiin ylös nesteestä ja jatkettiin imua, jolloin nesteen sijasta olki täyttyi ilmalla. Tämän jälkeen oljen avoin pää jälleen kastettiin nesteeseen ja imettiin nestettä olkeen. Kesimmäiseen nestepatsaaseen imettiin myös alkio/alkiot. Oljen avoimeen päähän jätettiin ilmatilaa, jotta olki voitoin sulkea erillisellä tulpalla, johon merkittiin juokseva numero. Excel-taulukkoon merkittiin kunkin numeron kohdalle oljen pakkauspäivämäärä, lehmän nimi ja korvanumero sekä oljessa olevan alkion/olevien alkioden lukumäärä, kehitysaste ja laatuluokka sekä käytetty säilytysliuos lyhenteillä H + FBS tai H + SR. Kumpaankin käsittelyyn oli tarkoitus saada yhtä monta alkioita tilastollisen luotettavuuden turvaamiseksi. Huuhteluiden päätyttyä 101 alkioita oli pakattu H+FBS- ja 102 alkioita H+SR -liuokseen. (Lindeberg 2017.)



KUVA 8. Tuorealkioiden pakkaus olkeen viileäkuljetusta varten.

Edellä kerrotun mukaisesti kuhunkin olkeen pakattiin ainoastaan yhden lehmän alkioita, jotka eroteltiin kehitysasteensa ja laatuluokkansa mukaan. Sen jälkeen alkiot jaettiin edelleen kahteen ryhmään, jotta noin puolet alkioista pakattiin H+FBS - ja puolet H+SR -liuokseen. Esimerkiksi lehmä A tuotti ensimmäisellä huuhtelukierroksella yhteensä 7 siirtokelpoista alkioita, jotka oli luokiteltu seuraavasti: kolme I-luokan blastokystiä (BI), kaksi II-luokan blastokystiä (BII) ja kaksi I-luokan kuoriutumassa olevaa blastokystiä (HdBI). Alkiot jaettiin kuuteen olkeen (taulukko 6).

TAULUKKO 6. Esimerkki alkioden pakkaamisesta viileäkuljetusta varten, lehmä A:n ensimmäisen huuhtelukierroksen siirtokelpoiset alkiot.

Olki	Viileäkuljetusliuos	Alkioiden lukumäärä	Alkioiden kehitysaste ja laatuluokka
1	H+FBS	2	B
2	H+FBS	1	B
3	H+FBS	1	HdB
4	H+SR	1	B
5	H+SR	1	B
6	H+SR	1	HdB

Tällainen alkioiden jakaminen olkiin mahdollisti sen, että viileäkuljetusliuosten vaikutusta eri kehitysasteisten alkioiden viileäsäilytyksen kestävyys voitiin myöhemmin verrata. Kun jokaisen lehmän alkioita pakattiin kumpaankin liuokseen, myös lehmäkohtainen alkioiden ominaisuuksien vaihtelu voitiin sulkea pois. Lisäksi tuloksista voitiin tarkastella, vaikuttiko alkioiden kehitysaste tai laatuluokka niiden edelleen kehittymiskykyyn viileäsäilytyksen jälkeen.

#### 4.2.2 Anti-Müllerian-hormonipitoisuuden määrittäminen

Anti-Müllerian-hormonipitoisuuden määrittämiseksi jokaiselta koeryhmän lehmältä kerättiin verinäyte ennen superovulaatiokäsittelyohjelman aloittamista, aloituskiimapäivänä. Verinäytteet otettiin lehmiä häntäsuonista 4 millilitran litiumhepariiniputkiin vakuumitekniikalla. Jokaisesta lehmästä kerättiin näyte molemmilla huuhtelukierroksilla, eli kokeen aikana kerättiin yhteensä kaksi näytettä lehmää kohti ja tutkittavaksi näytteitä lähetettiin 24.

Jotta veren plasma ja solut saatiin erotettua toisistaan, verinäytteet sentrifugoitiin. Sentrifugin pyörimisnopeus oli 4500 rpm (kierrosta minuutissa) ja näytteitä pyöritettiin 15 minuutin ajan. Sen jälkeen näytteistä eroteltiin plasma pipetin avulla pieniin kierrekorkillisiin putkiin ja putket pakastettiin välittömästi -20 asteeseen Minigrip-pusseissa, joihin merkittiin lehmien korvanumerot ja näytteenottopäivä. Näytteitä säilytettiin pakkasessa siihen saakka, kunnes ne lähetettiin hiilihappojäähän pakattuina analysoitaviksi Ruotsiin Uppsalaan SLU:hun (Sveriges Lantbruksuniversitet) tutkijaeläinlääkäri Bodil Strömin laboratorioon tammikuussa 2017. Tulokset saatiin toukokuussa 2017.

#### 4.2.3 Tuorealkioiden viileäkuljetus

Alkio-oljet pakattiin viileäkuljetuslaatikoihin (kuva 9). Kaksi viileäkuljetuslaatikkoa saatiin lainaksi tutkimuksen ajaksi Viking Geneticsiltä Hollolasta, alkionsiirtoeläinlääkäri Marja Mikkolan osallistuttua viileäkuljetuksen tutkimiseen. Viking Genetics oli aloittanut tuorealkioiden viileäkuljetukset maakuntiin, mutta samalla kiinnostunut tuorealkioiden viileäkuljetuksen kehittämistyöstä ja tämän tutkimuksen huuhtelualkiot palvelivat sopivasti myös heidän tutkimusmielenkiintoaan. Viileäkuljetuslaatikon pohjalle asetettiin ensin 3 kylmävaraajaa, joiden päälle asetettiin alkio-oljet kahden mustan, pehmeän ja puoli cm paksun kumieristeen välissä ja jälleen tämän päälle asetettiin kolme kylmävaraajaa, jotka pitivät laatikon sisälämpötilan sopivana (+4 °C) kahden vuorokauden ajan. Kylmävaraajia säilytettiin +4 °C:ssa kylmiössä ennen pakkaamista vähintään vuorokauden ajan.

Pakattu viileäkuljetuslaatikko vietiin autolla Kuopion Matkahuoltoon ja sieltä laatikko kuljetettiin bus-sirahtina joko Lahteen tai Forssaan seuraavaksi aamuksi, mikäli laatikko lähetettiin illalla klo 18:00. Mikäli laatikko lähti huuhtelupäivän jälkeisenä aamuna klo 8:00, se oli perillä saman päivän aikana. Jokioisilta viileäkuljetuslaatikko noudettiin joko Forssasta tai Lahdesta. Perillä Jokioisissa Jaana Peipon tutkimusryhmän alkiolaboratoriossa tutkija Mervi Mutikaisen toimesta oljet siirrettiin viileäkuljetuslaatikossa +4 asteeseen jääkaappiin säilytyksen loppuajaksi niin, että yhden, kolmen, viiden tai seitsemän vuorokauden viileässä oloaika täyttyi.



KUVA 9. Alkio-oljien pakkaaminen viileäkuljetuslaatikkoon (Säynäjärvi, 2017-04-05). a) Alkio-oljet asetettiin alkiokoteloon, b) Muovisen viileäkuljetuslaatikon pohjalle asetettiin harmaa Neopor-laatikko (styroksia), c) Neopor-laatikkoon laitettiin kolme DeltaT -kylmävaraajaa, joista ylimpänä olevan keskelle jäävään syvennykseen alkiokotelo asetettiin, d) Päälle asetettiin toiset kolme kylmävaraajaa, jolloin alkiokotelo jäi keskimmäiseksi varaajien väliin, e) Neopor-laatikko suljettiin (kansi- ja pohjaosa identtiset) ja sidottiin kiinni, f) Lopuksi viileäkuljetuslaatikko suljettiin kannella.

Kun oli aika siirtää alkiot jatkokasvatukseen, alkio-oljet otettiin jääkaapista ja tyhjennettiin niissä oleva neste nelikuoppamaljan kannelle ja tästä nesteestä alkiot etsittiin ja siirrettiin Holding-liuokseen uudelle maljalle odottamaan, että kaikki sillä kerralla jatkokasvatukseen siirrettävät alkiot oli saatu oljista ulos ja etsitty Holding -liuokseen odottamaan jatkokäsittelyä. Holding -liuosmaljalta alkiot pestiin kerran kaupallisessa alkionkasvatusliuoksessa G2 (G-2™, Vitrolife, Ruotsi) ja siirrettiin sitten oljittain omiin kuoppiinsa nelikuoppamaljoille G2-kasvatusliuokseen, johon oli lisätty 4 mg/ml rasvahappovapaata lehmän seerumin albumiinia (FAF-BSA, albumin, bovine fraction v powder fatty

acid free, A8806, Sigma-Aldrich Co., Yhdysvallat). Tämän jälkeen nelikuoppamaljat siirrettiin alkioiden kasvatuskaappiin, jossa alkioiden selviytymistä viileäsäilytyksestä seurattiin ottamalla malja stereomikroskoopin alle tarkasteltavaksi 24, 48 ja 72 tuntia jatkokasvatuksen aloittamisesta. Selvinneiksi katsottiin alkiot, jotka kehittyivät kasvatuksessa eteenpäin ja kuoriutuivat munasolun keton sisältä.

#### 4.3 Tutkimusaineiston käsittely ja analysointi

Huuhtelukaavakkeista peräisin olleet tiedot kirjattiin erikseen tutkimusta varten laadittuun Excel- taulukkoon. Taulukkoon kirjattiin kunkin lehmän nimi, lehmälle toteutettu superovulaatiokäsittely, alkiosaanto ja alkioidenkäsittelyliuos. Taulukko mukaili alkuperäistä huuhtelukaavakkeiden kirjaustapaa, mutta nyt luvut sijoitettiin siten, että taulukoiden ja kaavioiden luominen suoraan Excel- taulukkoon kirjatusta aineistosta oli helpompaa.

Siirtokelpoisten alkioiden lukumäärää tarkasteltaessa käytettiin parittaista T-testiä, koska jokaisesta lehmästä saatiin kaksi erilaista havaintoa. Tämän vuoksi havainnot olivat toisistaan riippuvaisia. Tulosten tarkastelussa merkitsevyytensä oli 5 prosenttia ( $p=0,05$ ). Tällä testillä saatiin vastaus nollahypoteesiin, joka oli asetettu tutkimuksen suunnitteluvaiheessa. Tulosten tarkastelua varten tehtiin myös useita kaavioita ja taulukoita, jotka havainnollistivat muuttujien vaikutusta alkiosaantoon.

Tuorealkioiden viileäsäilytyksen tulokset kirjattiin taulukkoon siten, että siitä kävivät ilmi viileäsäilytyksestä kestäneiden ja kestäättömien tuorealkioiden lukumäärät. Lisäksi viileäsäilytyksen kestäneiden alkioiden edelleen kehittymiskykyä jatkokasvatuksessa tarkasteltiin kirjaamalla taulukkoon alkiokehittämiseksi kunkin alkion kehitysasteen muuttuminen ja kuoriutuminen munasolun keton sisältä. Tuorealkioiden viileäsäilytyksen kestävyyttä tarkasteltaessa muuttujia oli niin useita, ettei tilastollisia testejä tehty.

#### 4.4 Tutkimuksen luotettavuus

Tutkimus on onnistunut, kun sen avulla saadaan luotettavia vastauksia asetettuihin tutkimuskysymyksiin. Tutkimus on tehtävä rehellisesti ja sen on oltava luotettava. Tutkimuksen pätevyydellä eli validiteetilla tarkoitetaan tutkimuksen kykyä mitata juuri sitä, mikä oli tarkoitus selvittää. Tutkimuksen validius kärsii, mikäli mitattavia muuttujia ja käsitteitä ei ole määritelty tarkasti. Silloin tutkimuksen tuloksetkaan eivät voi olla valideja. Tutkimuksen validiutta on vaikeaa tarkastella myöhemmin, joten se on varmistettava jo etukäteen tarkoin harkitulla tiedonkeruulla ja huolellisella suunnittelulla. (Heikkilä 2014, 27.)

Tutkimuksen luotettavuus eli reliabiliteetti puolestaan tarkoittaa tulosten tarkkuutta. On varmistettava, etteivät tutkimuksen tulokset ole sattumanvaraisia. Tutkimuksen on oltava kenen tahansa toistettavissa samanlaisin tuloksin. Koko tutkimuksen ajan tutkijan tulee olla kriittinen ja tarkka. Tutkimuksen tuloksiin vaikuttavia virheitä voi sattua aineistoa kerätessä, tallennettaessa, käsiteltäessä ja tuloksia arvioitaessa. (Heikkilä 2014, 28.)

Tässä opinnäytetyössä raportoitu tutkimus oli suunniteltu tarkasti vastaavien tutkijoiden toimesta. Tutkimusten tiedonkeruu suunniteltiin siten, että kaikki havainnot tutkimuksen edetessä pystyttiin kirjaamaan ylös mahdollisimman tarkasti. Tutkimusten edetessä kaikki kirjaukset tehtiin heti, jolloin tiedot olivat aina ajantasaiset ja oikeat. Kaikkia tutkittuja lehmiä pyrittiin käsittelemään mahdollisimman samankaltaisesti keskenään koko tutkimuksen ajan, eikä niiden käsittely tai ruokinta poikennut aiemmasta.

Kokeeseen valittiin 12 lypsylehmää. Lisääntymistutkimuksessa mukana olevien lehmien seuraava tiinehtyminen viivästyy ja siten poikimaväli pitenee, jonka vuoksi tutkimukseen otettiin mukaan kaikki lehmät, joita ei ollut tarkoitus enää tiineyttää ja näille pariksi yhtä monta lehmää, jotka oli tarkoitus tiineyttää kokeen jälkeen. Siten otoskooksi muotoutui 12. Otokoko pidettiin suhteellisen pienenä myös siksi, että tutkimus oli työläs ja suuremmalla lehmälukumäärällä käytännön toteuttamiseen olisi tarvittu toinen tutkija. Pieni otoskoko laskee tutkimuksen luotettavuutta, eikä tulosta voida siksi täysin yleistää. Luotettavuutta pyrittiin kuitenkin parantamaan siten, että kaikille tutkimukseen valituille lehmille oli suunniteltu tehtäväksi molemmat superovulaatiokäsittelyt, jonka avulla lehmäkohtaiset erot ja vaihtelut alkiontuottokyvyssä suljettiin pois. Lehmät reagoivat luonnostaan eri tavoin superovulaatiohormoniin: toinen tuottaa samalla käsittelyllä kymmeniä alkioita, toinen vain yhden tai muutaman alkion.

Anti-Müllerian-hormonipitoisuuden määrittämiseksi lehmistä kerättiin verinäytteitä. Vastaava tutkija keräsi itse verinäytteet tutkittavien lehmien häntäsuonesta superovulaatiokäsittelyn aloituskiimapäivänä. Monniauxin ym. (2010) mukaan verinäyte AMH-pitoisuuden määrittämiseksi voidaan ottaa jopa useita kuukausia ennen suunniteltua superovulaatiokäsittelyä. Nykykäsityksen mukaan AMH-pitoisuus voidaan tutkia myös jälkikäteen, koska sen on todettu pysyvän useiden kuukausien ajan muuttumattomana. Voidaan siis päätellä, ettei verinäytteiden keräämisen ajankohta vaikuta veren AMH-pitoisuuteen, kun näytteenotto on tehty ennen superovulaatiokäsittelyn aloittamista ja tulokset tulevat siten olemaan luotettavia.

Koska lehmät oli tarkoitus huuhdella neljän lehmän ryhmissä, vastaava tutkija pyysi mukaan alkionsiirtoeläinlääkäri Kirsi Vartian, joka huuhteli neljästä lehmästä kaksi ja vastaava tutkija itse toiset kaksi. Näin huuhteluihin kuuluva aika saatiin puolitettua ja alkiot etsittyä huuhtelunesteistä nopeammin. Alkioiden jatkokäsittelyt vastaava tutkija teki itse. Alkiohuuhteluissa ja verinäytteenotoissa avusti kuusi eri henkilöä (opinnäytetyöntekijä Sara Kukkonen, harjoittelijat Meeri Miettinen, Emmi Aineslahti ja Karoliina Kallela sekä Luken tutkijat Lilli Frondelius ja Annu Palmio). Lisäksi tutkimusnavetan työntekijät auttoivat aina tarvittaessa. Nämä tekijät saattoivat osaltaan vaikuttaa alkiohuuhteluiden onnistumiseen, eikä tekijöiden vaikutusta tuloksiin voida tarkasti arvioida. Voidaan kuitenkin olettaa, etteivät nämä tekijät vaikuttaneet merkittävästi huuhteluiden tuloksiin, sillä ammatikseen alkiohuuhteluita tekevä eläinlääkäri sai huuhteltavikseen lehmät, joiden kohdunkaula oli vaikea läpäistä jo kiiman aikana (yksi lehmä) tai peräsuolen supistukset olivat häiritsevän voimakkaat ilman selkäydinpuudutusta (neljä lehmää) ja tutkimustyötä tekevä tutkijaeläinlääkäri huuhteli etukäteen normaaleiksi arvioidut alkiohuuhtelut. Kaikkia avustajia neuvottiin ennen alkiohuuhtelua ja ohjeistettiin edelleen huuhtelun edetessä. Jokainen huuhtelu pyrittiin tekemään huolellisesti ja kohdunsarvet

huuhdeltiin huuhtelunesteellä jopa muutaman kerran useammin kuin normaalisti, jotta kaikki alkiot olisi varmasti saatu kerättyä.

Huuhdellut alkiot haettiin stereomikroskoopin avulla huuhtelunesteestä. Alkiot luokiteltiin niin laatu- ja kehitystasosta puolesta ja vastaava tutkija teki luokittelun pääasiassa itse, mutta muutamilla kerroilla häntä avusti myös alkionsiirtoeläinlääkäri. Alkiohuuhtelunesteellä täytetystä suodattimesta laskettiin ensin nestettä lavaariin niin paljon, että suodattimen alaosaan jäi noin 1 cm:n paksuinen kerros huuhtelunestettä. Suodattimessa on kaksi osaa, pohja- eli maljaosa ja kansi- eli suodatinosa. Suodatin avattiin irrottamalla suodatinosa maljaosasta, jolloin neste jäi maljaosaan ja suodatinosaan jäi limaa, jossa saattoi olla kiinnittyneenä alkioita. Siksi myös suodatinosa huuhdeltiin alkiohuuhtelunesteellä, jotta kaikki siihen tarttunut lima ja lima mahdollisesti tarttuneet alkiot olisi saatu irti ja maljoille löydettäväksi. Suodatinta huuhdeltiin ensin maljaosalle ja mikäli kaikki lima ei lähtenyt irti, uudelleen petrimaljalalle niin kauan, että suodattimen pinta oli täysin puhdas limasta. Sitten voitiin varmistaa, ettei suodattimeen jäänyt yhtään alkioita. Maljaosa ja petrimaljat tutkittiin mikroskoopin alla, ja aina alkion löytyessä se siirrettiin sormipipetillä pois huuhtelunesteestä pikkumaljalalle Holding -liuokseen odottamaan. Alkiot olivat huoneenlämmössä koko sen ajan, kunnes kaikki maljat oli käyty läpi. Tämä mahdollisesti vaikutti alkioiden säilyvyyteen, sillä ne saattoivat joutua olemaan huoneenlämmössä vaihtelevasti muutamasta tunnista aina seitsemään tuntiin ennen niiden pakkaamista olkiin ja siirtoa +4 °C lämpötilaan.

On mahdollista, että alkioita on saattanut jäädä huomaamatta maljoilta niitä etsittäessä. Tätä pyrittiin kuitenkin minimoimaan siten, että ennen alkiohuuhtelua lehmien lisääntymiselinten tarkastamisen yhteydessä laskettiin munasarjoissa olevien keltarauhasten lukumäärä. Keltarauhasten lukumäärän avulla voitiin ennustaa, kuinka monta alkioita tai hedelmöitymätöntä munasolua lehmältä tulisi vähintään huuhtelunesteestä löytyä. Mikäli alkioita etsittäessä löytyneiden alkioiden ja hedelmöitymättömien munasolujen yhteislukumäärä ei täsmännyt keltarauhasten lukumäärään, alkioiden etsimistä jatkettiin pääsääntöisesti niin kauan, että lukumäärät täsmäsivät. Mikäli lukumäärät eivät täsmänneet, alkioiden etsiminen lopetettiin viimeistään silloin, kun oli aika aloittaa alkioiden pakkaaminen olkiin, jotta viileäkuljetuslaatikko ehdittäisiin viedä matkahuoltoon ennen bussikuljetuksen lähtemisaikaa. Muutamassa huuhtelussa lukumäärät eivät täsmänneet, koska esimerkiksi osa yhden lehmän alkioista oli ehtinyt kuoriutua munasolun keton sisältä, jolloin niitä oli vaikea löytää huuhtelunesteestä. Huuhteluneste irrottaa kohdun limakalvolta paljon solumassaa ja alkioita ilman munasolun kettoa on vaikea erottaa tästä solumassasta, jolloin alkiot jäävät helposti huomaamatta.

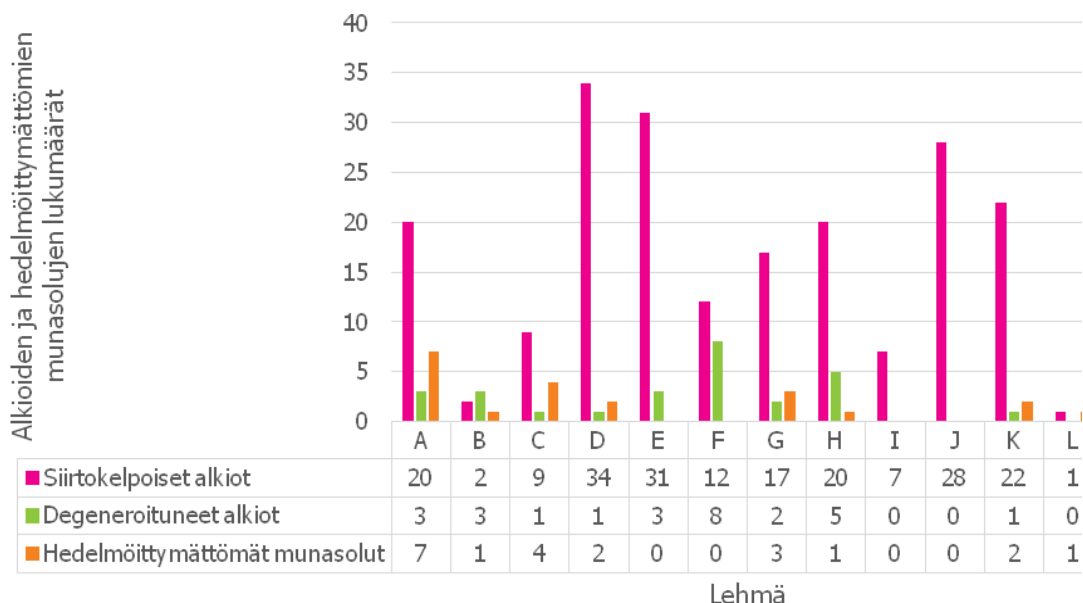
## 5 TUTKIMUKSEN TULOKSET

Alkioita huuhdeltiin 12 lehmältä yhteensä 21 kertaa. Lehmistä yhdeksän huuhdeltiin kaksi kertaa ja kolme lehmää vain kerran. Tuotetuilla siirtokelpoisilla alkioilla tutkittiin tuorealkioiden viileäsäilytyksen kestävyyttä ja alkioiden edelleen kehittymiskykyä viileäsäilytyksen jälkeen. Kaikkiaan siirtokelpoisia alkioita tuotettiin 203 kappaletta ja ne pakattiin 109 olkeen.

Anti-Müllerian-hormonipitoisuuksien (AMH) määrittämiseksi kerättyjen verinäytteiden tulokset valmistuivat toukokuussa 2017 tämän opinnäytetyön julkaisemisen jälkeen. Sen vuoksi niitä ei tarkastella tässä työssä lainkaan. AMH-näytteiden tulokset Luonnonvarakeskus julkaisee myöhemmin.

### 5.1 Alkiohuuhteluiden tulokset

Tutkimuksen aikana tehtiin yhteensä 21 alkiohuuhtelua, joiden tuloksena saatiin yhteensä 251 alkioita ja hedelmöittymätöntä munasolua eli ufoa (ufo = unfertilized ova). Huuhteluista 11 tehtiin ensimmäisellä kierroksella ja 9 toisella huuhtelukierroksella. Kaikkiaan kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotettiin 155 alkioita ja ufoa, joista 122 (78,7 prosenttia) oli siirtokelpoisia alkioita ja 33 (21,3 prosenttia) siirtokelvottomia alkioita tai ufoja. Uudella, kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotettiin 96 alkioita ja ufoa, joista siirtokelpoisia alkioita oli 81 (84,4 prosenttia) ja siirtokelvottomia alkioita tai ufoja 15 (15,6 prosenttia). Tässä tutkimuksessa kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma tuotti enemmän siirtokelpoisia alkioita suhteessa siirtokelvottomiin kuin kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma. Kaikista huuhdelluista alkioista 203 kappaletta (80,9 prosenttia) oli siirtokelpoisia alkioita, 27 kappaletta (10,7 prosenttia) degeneroituneita eli surkastuneita, elinkelvottomia alkioita ja 21 kappaletta (8,4 prosenttia) hedelmöittymättömiä munasoluja eli ufoja (kuvio 6).



KUVIO 6. Kaikki tutkimuksessa tuotetut alkioit lehmäkohtaisesti.



Molempien huuhtelukierrosten yhteenlaskettu alkiotuotto nykyisin käytössä olevalla kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla oli keskimäärin  $11,00 \pm 6,85$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkiota huuhtelua kohti (kuvio 7), kun taas kahden pistoksen käsittelyohjelmalla keskimäärin  $8,20 \pm 5,79$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkiota huuhtelua. Tulos puoltaa nykyistä superovulaatiokäsittelyohjelmaa, mutta kuitenkin tässä tutkimuksessa ryhmä B tuotti uudella superovulaatiokäsittelyohjelmalla 1. huuhtelukierroksella keskimäärin 10 siirtokelpoista alkiota huuhtelua kohti, mikä viittaa siihen, että myös kahden pistoksen käsittelyohjelma tuottaa onnistuessaan hyvän superovulaatiovasteen.

Ensimmäisellä huuhtelukierroksella alkiohuuhtelu tehtiin 11 lehmälle. Superovulaatiokäsittelyohjelma aloitettiin kiimojen synkronoinnin jälkeen vain 11 lehmälle, koska yksi lehmä (L) tuli aloituskiimaansa liian myöhään eli 7 vrk prostaglandiinipistoksen jälkeen, eikä sille tästä johtuen aloitettu superovulaatiokäsittelyä 1. huuhtelukierroksella. Lehmän L reagoitua epätoivotusti kiiman synkronointiin sen toisen kierroksen superovulaatiokäsittely aloitettiin normaalista kiimasta ilman kiiman synkronointia. Siten lehmä L alkiohuuhdeltiin toisella huuhtelukierroksella yksin omana huuhtelupäivänään.

Kaikkiaan ensimmäisen kierroksen 11 alkiohuuhtelua tuottivat 97 siirtokelpoista alkiota, joista 37 kpl tuotettiin kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla ( $n = 5$  lehmää) ja 60 kpl kahden pistoksen käsittelyohjelmalla ( $n = 6$  lehmää). Kahdeksan pistoksen käsittelyohjelma tuotti ensimmäisellä huuhtelukierroksella keskimäärin  $7,40 \pm 3,65$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkiota huuhtelua kohti ( $n = 5$  lehmää) ja kahden pistoksen käsittelyohjelma ( $n = 6$  lehmää) tuotti keskimäärin  $10,00 \pm 5,29$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkiota huuhtelua kohti.

Toinen huuhtelukierros tuotti molemmat käsittelyohjelmat yhteenlaskettuna paremmin alkioita yhtä huuhtelua kohti kuin ensimmäinen, yhteensä keskimäärin  $10,60 \pm 8,06$  ( $\pm$ keskihajonta) ensimmäisen kierroksen alkiosaannon ollessa keskimäärin  $8,82 \pm 4,60$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkiota huuhtelua kohti. Toisella kierroksella kahdeksan pistoksen käsittelyohjelmalla saatiin keskimäärin jopa  $14,00 \pm 7,72$  ( $\pm$ keskihajonta), kun taas kahden pistoksen käsittelyohjelma tuotti keskimäärin  $7,33 \pm 6,14$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkiota huuhtelua kohti.

Toisella huuhtelukierroksella kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmassa kahta lehmää (B ja I) ei huuhdeltu lainkaan. Lehmä B ei tullut käsittelyn jälkeen kiimaan, jolloin huuhtelusiemennyksiä ei tehty. Ultraäänitutkimus paljasti, ettei lehmä B ollut ovuloinut yhtään follikkeliä. Lehmä I puolestaan ei superovuloinut vaan kasvatti ainoastaan kaksi follikkeliä ja ovuloi niistä toisen, eikä sitä sen vuoksi huuhdeltu yhden alkion toivossa. Lisäksi toisella kierroksella kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla tehtiin yksi alkiohuuhtelu (lehmä F), josta ei saatu lainkaan siirtokelpoisia alkioita, eikä lehmän toisen kierroksen alkiosaanto ole siten mukana tuloksissa kuviossa 8, koska lehmä F sairastui utaretulehdukseen toisella huuhtelukierroksella.

	Nykyinen, kahdeksan pistoksen käsittelyohjelma	Uusi, kahden pistoksen käsittelyohjelma	
1. huuhtelukierros	<b>Ryhmä A</b>	<b>Ryhmä B</b>	
	n = 5 j = 37 $\bar{x}$ = 7,40	n = 6 j = 60 $\bar{x}$ = 10,00	n = 11 j = 97 $\bar{x}$ = 8,82
2. huuhtelukierros	<b>Ryhmä B</b>	<b>Ryhmä A</b>	
	n = 6 j = 84 $\bar{x}$ = 14,00	n = 3 j = 22 $\bar{x}$ = 7,33	n = 10 j = 106 $\bar{x}$ = 10,60
	n = 11 j = 121 $\bar{x}$ = 11,00	n = 10 j = 82 $\bar{x}$ = 8,20	

n= huuhdeltujen lehmien lukumäärä

j= huuhdeltujen siirtokelpoisten alkioiden lukumäärä

$\bar{x}$ = tuotettujen siirtokelpoisten alkioiden keskiarvo

KUVIO 7. Tutkimuksen alkiohuuhteluiden tulokset, siirtokelpoiset alkiot.

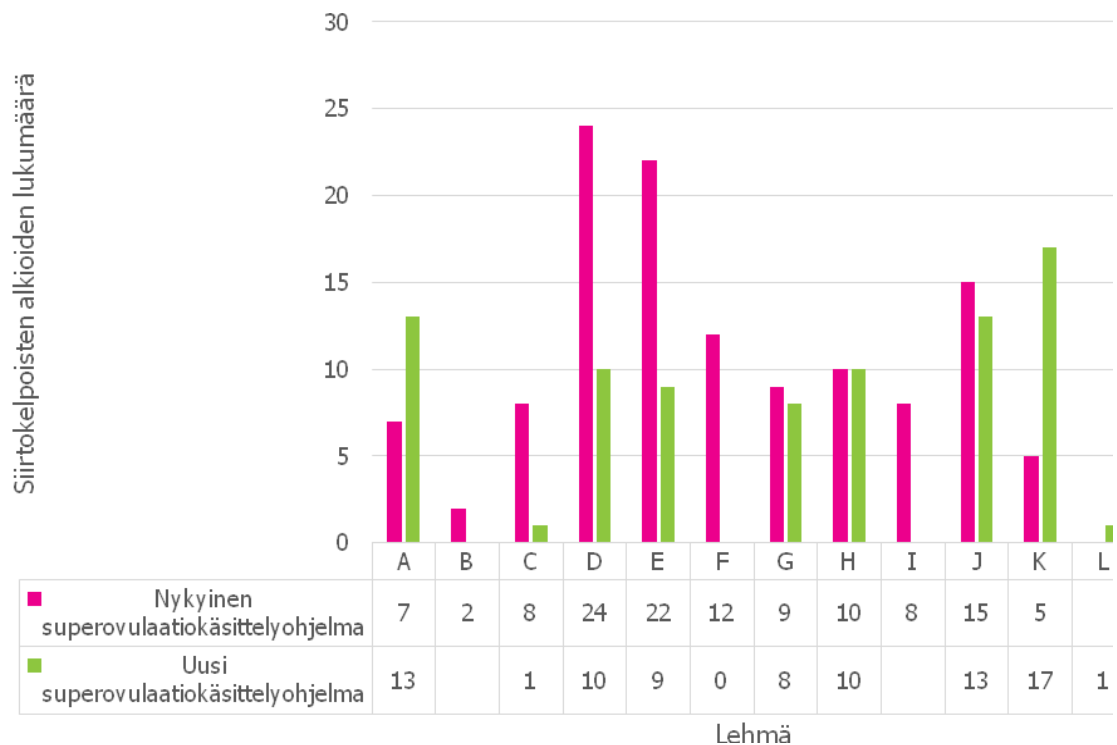
Ensimmäisellä huuhtelukierroksella ryhmälle A (n = 5 lehmää) toteutettiin nykyinen superovulaatiokäsittelyohjelma. Ryhmään kuuluivat lehmät A, B, F, G ja I. Lehmä L ei tullut määrättyssä ajassa aloituskiimaansa ja putosi siksi pois superovulaatiokäsittelyohjelmasta, eikä sille tehty alkiohuuhtelua lainkaan ensimmäisellä kierroksella. Ryhmän A lehmien siirtokelpoisten alkioiden tuotto vaihteli kahdesta alkioista 12 alkioon. Ryhmälle B (n = 6 lehmää) toteutettiin puolestaan uusi superovulaatiokäsittelyohjelma ja ryhmään kuuluivat lehmät C, D, E, H, J ja K. Ryhmän B lehmien siirtokelpoisten alkioiden tuotto vaihteli yhden ja 17 alkion välillä.

Toisella huuhtelukierroksella ryhmille toteutetut superovulaatiokäsittelyohjelmat käännettiin päinvastoin, eli ryhmälle A toteutettiin uusi, kahden pistoksen superovulaatiokäsittely ja ryhmälle B nykyinen, kahdeksan pistoksen käsittely. Ryhmän B (n = 6 lehmää) alkiohuuhteluissa saatujen siirtokelpoisten alkioiden lehmäkohtainen lukumäärä vaihteli viiden ja 24 alkion välillä. Ryhmään A kuuluneilta lehmiltä (n = 3) huuhdeltujen siirtokelpoisten alkioiden lukumäärä vaihteli yhden ja 13 alkion välillä. Ryhmän B kuuden lehmän kiimojen yhdenaikaistaminen onnistui molemmilla huuhtelukierroksilla hyvin ja kaikki lehmät saatiin superovulaatiokäsiteltä ja huuhdeltua kummallakin huuhtelukierroksella. Ryhmä B tuotti myös kummallakin superovulaatiokäsittelyohjelmalla paremmin siirtokelpoisia alkioita kuin ryhmä A. Ryhmän A lehmien kiimojen yhdenaikaistaminen onnistui vain yhdellä kuudesta lehmästä niin, että se saatiin superovulaatiokäsiteltä ja huuhdeltua ohjelman mukaisesti omassa neljän lehmän alaryhmässään. Kahden muun onnistuneesti huuhdellun lehmän superovulaati-

tiokäsittely aloitettiin lehmien luonnollisesta kiimasta. Huuhtelukierrosten välissä tehty kiimojen yhdenaikaistaminen oli selkeästi haitallisempi, jos lehmälle oli tehty nykyinen, kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittely ensin kuin jos oli tehty ensimmäisenä uusi kahden pistoksen käsittelyohjelma.

Siirtokelvottomia alkioita ja ufoja huuhdeltiin tutkimuksessa kaikkiaan 48 kappaletta, joka on 19,1 prosenttia kaikista tutkimuksessa huuhdelluista rakenteista. Näistä 69 prosenttia (33 kappaletta) tuotettiin nykyisin käytössä olevalla superovulaatiokäsittelyllä ja 31 prosenttia (15 kappaletta) uudella superovulaatiokäsittelyllä.

Tutkimukseen valituista 12 lehmästä kahdeksan huuhdeltiin onnistuneesti molemmilla kierroksilla. Lopullisissa tuloksissa huomioidaan erityisesti juuri näiden onnistuneesti molemmilla kierroksilla alkiohuuhdeltujen lehmien tulokset, jotta tulos ei vääristy. Parhaimman huuhtelutuloksen tuotti lehmä D (24 siirtokelpoista alkioita), jolle oli ennen huuhtelua toteutettu kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma (kuvio 8). Se tuotti myös parhaimman molempien huuhtelukierrosten yhteenlasketun huuhtelutuloksen, yhteensä 34 siirtokelpoista alkioita. Tämä selittyy sillä, että lehmän D hormonihoitovaste oli hyvä. Kahdeksasta onnistuneesti huuhdellusta lehmästä vähiten siirtokelpoisia alkioita tuotti lehmä C (yksi siirtokelpoinen alkio), jolle oli ennen huuhtelua toteutettu uusi superovulaatiokäsittelyohjelma.

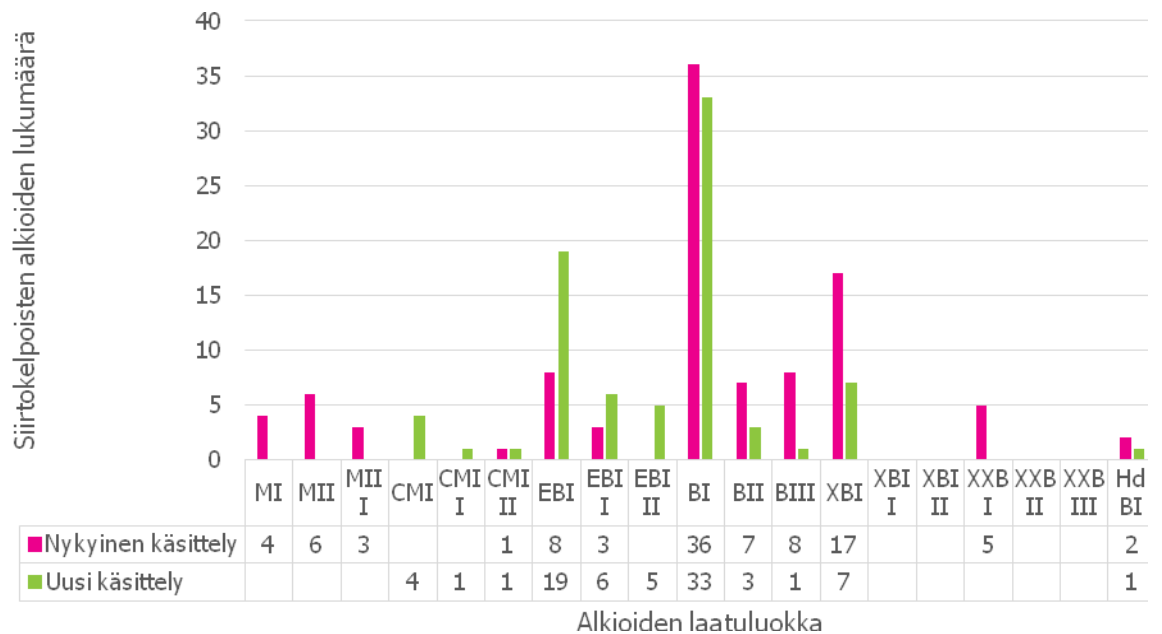


KUVIO 8. Kahden huuhtelukierroksen aikana huuhdeltujen lehmien (n = 12) tuottamien siirtokelpoisten alkioiden lukumäärät.

Molemmilla kierroksilla onnistuneesti alkiohuuhdellut kahdeksan lehmät tuottivat keskimäärin  $12,50 \pm 7,11$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkioita alkiohuuhtelua kohti nykyisin käytössä olevalla superovulaatiokäsittelyohjelmalla. Uudella, kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla nämä lehmät tuottivat keskimäärin  $10,13 \pm 4,67$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkioita huuhtelua kohti. Lehmät A ja K tuottivat uudella, kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyllä alkioita enemmän kuin nykyisin käytössä olevalla käsittelyllä ja ero tuotettujen alkioiden lukumäärän välillä oli huomattava – lehmällä K jopa 12 siirtokelpoista alkioita. Tosin lehmän K alkioista osa oli jo kuoriutuneita, joten osa alkioista on voinut jäädä löytymättä. Lehmät C, D, E ja F tuottivat nykyisin käytössä olevalla superovulaatiokäsittelyllä selkeästi enemmän alkioita, kuin uudella käsittelyllä, lehmä D jopa 14 alkioita enemmän. Lehmät D ja E tuottivat kuitenkin myös uudella, kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla siirtokelpoisia alkioita jopa yhdeksän ja 10 huuhtelua kohti, joka on esimerkiksi Suomen nykyistä siirtokelpoisten alkioiden keskimääräistä saantoa parempi tulos. Lehmä H tuotti molemmilla superovulaatiokäsittelyillä yhtä monta siirtokelpoista alkioita.

Edellä mainitut kahdeksan lehmää tuottivat siirtokelpoisia alkioita yhteensä 181, joista 100 (55,25 prosenttia) tuotettiin nykyisellä superovulaatiokäsittelyohjelmalla ja 81 (44,75 prosenttia) uudella superovulaatiokäsittelyohjelmalla. Tämän tutkimuksen mukaan käsittelyjen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa ( $p=0,47$ ), kun mukaan otetaan näiden kahdeksan lehmän tulos, joille tehtiin molemmat superovulaatiokäsittelyt. Testaus tehtiin parittaisen t-testin avulla huomioiden näiden kahdeksan lehmän siirtokelpoiset alkioita, jotka huuhdeltiin molemmilla kierroksilla. Kun testi tehdään kaikille tutkimuksessa mukana olleille lehmille siirtokelpoisten alkioiden osalta, myöskään silloin tilastollisesti merkitsevää eroa käsittelyjen välillä ei tämän tutkimuksen mukaan ole ( $p=0,32$ ).

Siirtokelpoisista alkioista selkeästi suurin osa (69 alkioita) luokiteltiin kehitysasteeltaan I-luokan blastokysteiksi (kuvio 9). Vähiten oli I-luokan moruloita (yksi alkio). Laadultaan näistä alkioista suurin osa oli I-luokkaisia (131 kappaletta), toiseksi eniten oli II-luokkaisia (31 alkioita) ja vähiten III-luokkaisia (19 alkioita). Kehitysasteeltaan alkioita olivat suurimmaksi osaksi blastokystejä (88 alkioita), vähiten oli kuoriutuneita blastokystejä (kolme alkioita).



KUVIO 9. Tuotettujen siirtokelpoisten alkioiden luokittelu kehitysasteen ja laatuiluokan mukaan (molemmilla kierroksilla onnistuneesti alkiohuuhdeltujen kahdeksan lehmän siirtokelpoiset alkiot).

Molemmilla kierroksilla onnistuneesti alkiohuuhdellut kahdeksan lehmää tuottivat laatuiluokaltaan I-luokkaisia alkioita tutkimuksessa eniten ja niitä oli yhteensä 131, joista 72 tuotettiin nykyisellä kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla ja 59 uudella kahden pistoksen käsittelyohjelmalla. Nykyisin käytössä olevalla superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotetuista siirtokelpoisista alkioista 72,0 prosenttia oli I-luokkaisia, 16,0 prosenttia II-luokkaisia ja 12,0 prosenttia III-luokkaisia. Uudella superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotetuista alkioista 79,0 prosenttia oli I-luokkaisia, 12,3 prosenttia II-luokkaisia ja 8,6 prosenttia III-luokkaisia. Nykyisellä kahdeksan pistoksen käsittelyohjelmalla tuotetut siirtokelpoiset alkiot jakautuivat kehitysluokkien morula ja kuoriutunut blastokysti väliin. Uudella superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotetut alkiot jakautuivat kuitenkin tätä suppeammin luokkien tiivistynyt eli kompakti morula ja kuoriutunut blastokysti väliin.

## 5.2 Tuorealkioiden viileäsäilytyksen kestävyys

Kaikki tutkimuksessa huuhdellut siirtokelpoiset alkiot (203 alkioita) pakattiin alkio-olkiin ja lähetettiin viileäkuljetuksessa Luonnonvarakeskuksen Jokioisten toimipisteeseen, jossa niiden edelleen kehittymiskykyä viileäkuljetuksen ja -säilytyksen (+4 °C) jälkeen tutkittiin. Alkioita kuljetettiin ja säilytettiin viileässä yhteensä yhden, kolmen, viiden tai seitsemän vuorokauden ajan, jonka jälkeen ne siirrettiin kaupalliseen G2-liuokseen jatkokasvatukseen. G2-liuokseen lisättiin rasvahappovapaata naudan seerumin albumiinia (FAF-BSA), joka toimi valkuaisainelähteenä alkioille sekä esti alkioita tarttumasta erilaisiin pintoihin tai pipetteihin. Alkioiden elinvoimaisuutta tarkasteltiin ensimmäisen kerran, kun ne olivat olleet jatkokasvatuksessa kasvatuskaapissa 24 tuntia +39 °C:ssa G2-liuoksessa, jonka jälkeen kaikki tuorealkiot laitettiin takaisin kasvatuskaappiin. Kun toinen vuorokausi oli kulunut (alkiot olivat olleet yhteensä 48 tuntia kasvatuskaapissa), selkeästi elinvoimaiset eli kuoriutuneet tuorealkiot pakastettiin geeninäytteeksi toista tutkimusta varten. Kolmanneksi vuorokauksi kasvatuskaappiin jä-

tettiin sellaiset alkiot, jotka eivät vielä olleet kuoriutuneet tai jotka eivät olleet osoittaneet vielä mitään elonmerkkejä. Kolmannen tarkastelun, eli 72 tunnin kuluttua kaikki vähänkin elonmerkkejä osoittaneet alkiot pakastettiin geeninäytteiksi ja selkeästi kuolleet alkiot hävitettiin.

Viileäsäilytyksen kestäneet alkiot pakastettiin toista tutkimusta varten geeninäytteiksi. Tässä opinäytetyössä ei käsitellä kyseistä jatkotutkimusta lainkaan. Kaikista 203 viileäsäilytetystä alkioista kolme jäi löytymättä olkia tyhjennettäessä. Neljä alkioita pakastettiin geeninäytteiksi heti viileäkuljetuksen ja -säilytyksen jälkeen. Näistä suoraan geeninäytteiksi pakastetuista alkiosta ei voida sanoa, olivatko ne kestäneet viileäsäilytyksen, koska niitä ei jatkokasvatettu. Jatkokasvatukseen siirrettiin 196 alkioita, joista voitiin tutkia viileäsäilytyksen kestävyyttä ja säilytyksen jälkeistä edelleen kehittymiskykyä eli sitä, pystyivätkö alkiot kuoriutumaan munasolun keton sisältä jatkokasvatuksessa. 72 tunnin jatkokasvatuksen jälkeen todettiin, että 89 alkioita eivät olleet osoittaneet mitään elonmerkkejä koko 72 tunnin jatkokasvatuksen aikana eli olivat tulleet oljista ulos kuolleina. 6 alkioita osoitti elonmerkkejä jatkokasvatuksessa, mutta kuoli ennen jatkokasvatuksen päättymistä. Nämä ja edelliset 89 alkioita hävitettiin jatkokasvatuksen päätyttyä. 56 alkioita kerättiin geeninäytteeksi 48 tunnin jatkokasvatuksen jälkeen eli ne olivat kaikki kuoriutuneet jo 24 tunnin kohdalla tai 48 tuntiin mennessä. Nämä alkiot olivat kaikkein elinvoimaisimmat. Lisäksi 45 alkioita kerättiin geeninäytteiksi 72 tunnin jatkokasvatuksen jälkeen. Näistä vielä elossa olleista 45 alkioista 15 oli kuoriutunut ja 30 oli joko kuoriutumassa tai blastokysti-laajentunut blastokystivaiheessa.

Alkiot oli pakattu viileäkuljetusta ja -säilytystä varten kahteen eri käsittelyliuokseen (H+FBS tai H+SR), jotta mahdolliset käsittelyliuoksen aiheuttamat erot alkioiden kestävyudessa voitaisiin havaita tuloksista. Koska alkiot jaettiin näihin kahteen eri liuokseen ja säilytysaika +4 asteessa vaihteli 1 ja 7 vuorokauden välillä, tuloksissa on monta muuttujaa (taulukko 7).

Alkiot kestivät parhaiten yhden vuorokauden viileäsäilytyksen kummassakin säilytysliuoksessa (69,7 ja 72,7 prosenttia alkiosta kuoriutui) ja huonoiten seitsemän vuorokauden viileäsäilytyksen (alle 10 prosenttia alkiosta kuoriutui). Kolmen ja viiden vuorokauden viileäsäilytyksen välillä ei ollut huomattavaa eroa alkioiden kuoriutumisessa (17,4–35,3 prosenttia alkiosta kuoriutui).

TAULUKKO 7. Viileäkuljetuksen ja -säilytyksen jälkeisessä jatkokasvatuksessa elävien ja kuoriutuneiden alkioiden lukumäärät (n = 196).

Säilytysliuos ja säilytysaika +4 asteessa	Alkioiden lukumäärä n = 196	Jatkokasvatuksen kesto					
		24 tuntia		48 tuntia		72 tuntia	
		Elävät alkiot (%)	Kuoriutuneet alkiot (%) <sup>1</sup>	Elävät alkiot (%)	Kuoriutuneet alkiot (%) <sup>1</sup>	Elävät alkiot (%)	Kuoriutuneet alkiot (%) <sup>1</sup>
H+SR 1 vrk	33	27 (81,8)	6 (18,2)	27 (81,8)	22 (66,7)	27 (81,8)	24 (72,7)
H+FBS 1 vrk	33	28 (84,8)	4 (12,1)	28 (84,8)	18 (54,5)	28 (84,8)	23 (69,7)
H+SR 3 vrk	17	12 (70,6)	0 (0)	12 (70,6)	4 (23,5)	10 (58,8)	6 (35,3)
H+FBS 3 vrk	23	11 (47,8)	0 (0)	11 (47,8)	4 (17,4)	10 (43,5)	5 (21,7)
H+SR 5 vrk	23	10 (43,5)	1 (4,3)	10 (43,5)	4 (17,4)	8 (34,8)	4 (17,4)
H+FBS 5 vrk	21	10 (47,6)	0 (0)	10 (47,6)	4 (19,1)	10 (47,6)	6 (28,6)
H+SR 7 vrk	23	6 (26,1)	0 (0)	6 (26,1)	0 (0)	6 (26,1)	2 (8,7)
H+FBS 7 vrk	23	3 (13,0)	1 (4,4)	2 (8,7)	0 (0)	2 (8,7)	1 (4,4)

<sup>1</sup>24 tunnin kohdalla kuoriutuneet alkiot ovat mukana myös 48 ja 72 tunnin kuoriutuneiden alkioiden lukumäärissä. Lisäksi 48 tunnin kohdalla kuoriutuneet alkiot ovat mukana 72 tunnin kuoriutuneiden alkioiden lukumäärässä.

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Eri käsittelyohjelmilla tuotettujen ja huuhdeltujen, siirtokelpoisten alkioiden lukumääriä tarkasteltiin parittaisen t-testin avulla. T-testin mukaan tilastollisesti merkitsevää eroa näiden käsittelyjen välillä ei ollut. Tutkimukseen valittujen lehmien otoskoko oli kuitenkin pieni ( $n = 12$ ), ja näistä lehmistä kahdeksan saatiin huuhdeltua onnistuneesti molemmilla kierroksilla. Tutkimuksessa lehmäkohtaiset erot alkiontuottokyvyn ja hormonihoitovasteen välillä haluttiin sulkea pois, minkä vuoksi kaikille tutkituille eläimille olisi haluttu toteuttaa molemmat superovulaatiokäsittelyt. Laajempi otoskoko lisäisi tuloksen luotettavuutta. Tutkimustulos antaa kuitenkin selkeästi viitteitä siitä, että kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmaa kannattaisi tutkia lisää.

Niiden kolmen lehmän, jotka huuhdeltiin ainoastaan yhden kerran, epäonnistuneeseen superovulaatiokäsittelyyn vaikutti kunkin lehmän kohdalla jokin muu, kuin superovulaatiokäsittelyohjelmasta johdettu tekijä. Lehmä L oli ainoa ensimmäiseltä huuhtelukierrokselta poisjäänyt lehmä. Ryhmään A kuuluvana sille oli määrä aloittaa nykyinen superovulaatiokäsittelyohjelma. Se tuli ensimmäisen kierroksen kiimojen yhdenaikaistamiseen käytetyn prostaglandiinipistoksen jälkeen aloituskiimaansa vasta 7 vrk pistoksen jälkeen, kun normaalisti lehmät reagoivat pistokseen 2–5 vuorokaudessa, jolloin sille ei aloitettu superovulaatiokäsittelyohjelmaa lainkaan. Eläin saatiin kuitenkin huuhdeltua toisella kierroksella, kun sille toteutettiin kahden pistoksen superovulaatiokäsittely, mutta käsittely aloitettiin ilman kiiman yhdenaikaistamista lehmän L luonnollisesta kiimasta.

Toisella huuhtelukierroksella kokonaan huuhtelematta jäi kaksi lehmää (lehmät B ja I). Lehmän B toisen huuhtelukierroksen superovulaatiokäsittely epäonnistui todennäköisesti sen vuoksi, että lehmällä oli keskimääräistä pidempi kiimakierto (26–27 vrk), eikä käsittelyn normaali aloituspäivä 9.-12. päivänä aloituskiimasta sopinut sen pitkään kiimakiertoon. Sen munasarjoissa ei todennäköisesti ollut 9.-12. päivänä aloituskiimasta sopivia pieniä follikkeleita, joihin superovulaatiohormoni olisi voinut vaikuttaa. Ensimmäisellä huuhtelukierroksella lehmän B hormonikäsittely aloitettiin sattumalta kiimakierron päivänä 13. ja silloin lehmä B superovuloitui ja tuotti kaksi siirtokelpoista alkioita.

Lehmällä I oli entuudestaan sairaushistoriaa tapaturmaisen kinnervamman vuoksi kahden vuoden takaa. Tästä huolimatta se valikoitui kokeeseen, sillä jalkavaivoista oli toistaiseksi päästy ja lehmä sopi tuotosvaiheensa puolesta tähän tutkimukseen. Superovulaatiohormonin ansiosta lehmien kiimäkäyttäytyminen oli todella voimakasta neljän lehmän ryhmässä ja lehmän I jalka loukkaantui todennäköisesti ensimmäisen huuhtelukierroksen kiiman aikana. Toisen kierroksen kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelman jälkeen lehmää ei huuhdeltu, sillä se ei superovuloitunut. Kinnernivel tulehtui niin pahasti, että lehmä hoidettiin 5 päivän kipulääke- ja 10 päivän antibioottikuurilla, mutta lehmä jouduttiin lopulta poistamaan karjasta kokonaan. Jalkavaivoilla on selkeä yhteys hedelmällisyshäiriöihin (Lindeberg, 2017).

Lehmä F huuhdeltiin molemmilla kierroksilla, mutta toisella huuhtelukierroksella siltä saatiin kahdeksan degeneroitunutta eli surkastunutta alkioita eikä siirtokelpoisia alkioita lainkaan. Tähän todennä-



köisesti vaikutti se, että lehmä F sairastui utaretulehdukseen (ei kuumetta, CMT (California Mastitis Test) 5 solut kolmessa utareneljänneksessä) juuri ennen toisen käsittelykierroksen alkua, jonka vuoksi superovulaatiokäsittelyn lopputulos oli huono. Koska lehmällä ei ollut muita yleisoireita kuin solutusta maidossa, vastaava tutkija päätti aloittaa superovulaatiokäsittelyn. Utaretulehdus on kuitenkin saattanut vaikuttaa siihen, että lehmän F huuhtelussa saatiin vain surkastuneita alkioita. Tästä johtuen myös lehmän F tulos jätettiin pois tutkimuksen lopullisesta tuloksesta kolmen muun vain kerran huuhdellun lehmän tuloksen lisäksi.

Huomionarvoista on myös se, että kaksi kertaa onnistuneesti huuhdelluista kahdeksasta lehmästä yhtä (lehmä H) ei saatu toisella kierroksella ohjelman mukaisesti emätinkierukalla yhdenaikaistettuun toisen kierroksen aloituskiimaan vaan lehmä kehitti munasarjarakkulat, jotka piti ensin hoitaa. Hoidon jälkeen lehmälle saatiin tehtyä toisen kierroksen kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma lehmän luonnollisesta kiimasta. Toinen lehmä (lehmä G) tuli kyllä toisen kierroksen aloituskiimaansa ja sille tehtiin toisella kierroksella kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma, mutta lehmää ei siemennetty, koska se ei näyttänyt selkeästi kiimaansa. Myöhemmin ultraäänitutkimuksessa selvisi, että lehmä G oli kuitenkin ovuloinut kaksi follikkeliä. Lehmälle G tehtiin kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma uudelleen sen luonnollisesta kiimasta noin kuukausi edellisestä yrityksestä ja tuolloin niin käsittely kuin alkiohuuhtelukin onnistuivat. Molemmat lehmät H ja G olivat jo poistolistalla jalkaongelmien vuoksi ja kuten jo aiemmin todettiin, jalkavaivoilla on selkeä yhteys hedelmällisyshäiriöihin, varsinkin luteinisoivan hormonin erittymiseen, jota tarvitaan ovulaation aikaansaamiseen.

Toisen käsittelykierroksen ja alkiohuuhtelun jälkeen lehmillä C ja D ilmeni ongelmia lisääntymiselinten terveydessä. Näille kummallekin lehmälle oli toisella käsittelykierroksella toteutettu nykyisin käytössä oleva kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittely. Lehmillä C ja D todettiin noin kuukausi toisen kierroksen huuhteluiden jälkeen munasarjarakkulat, jotka hoidettiin onnistuneesti. Molemmat lehmät tiinehtyivät hoidon jälkeen, mutta lehmällä D ilmeni emättimen esiinluiskahdusta jo ennen hoitoa. Emättimen esiinluiskahdus paheni koko ajan ja lehmä D jouduttiin lopulta sen vuoksi poistamaan karjasta kokonaan. Esiinluiskahduksen puhkeamiseen saattoivat vaikuttaa peräkkäiset superovulaatiokäsittelyt ja niiden jälkeen lauennut rakkulasyndrooma, jonka aikana estrogeenipitoisuus oli koholla. Korkea estrogeenipitoisuus edesauttaa lantion siteiden löystymistä, jonka seurauksena voi olla emättimen ulostyöntyminen.

Tutkimuksessa tehtiin yhteensä 21 alkiohuuhtelua. Niistä yksi, lehmälle K toisella kierroksella tehty alkiohuuhtelu epäonnistui, koska osa alkioista oli ilmeisesti jo kuoriutunut (huuhtelunesteestä löydettiin tyhjiä munasolun kettoja). Toisekseen ensimmäisen sarven huuhtelun aikana suodatin ei toiminut kunnolla, koska suodattimen ilma-aukko ei ollut täysin auki ja nestettä tulvi suodattimesta sen vuoksi yli. Yli vuotaneen huuhtelunesteen mukana saatettiin menettää alkioita. Lehmälle K oli toisella kierroksella toteutettu nykyisin käytössä oleva superovulaatiokäsittelyohjelma.

Molemmilla kierroksilla onnistuneesti alkiohuuhteltuja lemiä oli yhteensä kahdeksan. Nämä lehmät tuottivat keskimäärin  $12,50 \pm 7,11$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkioita alkiohuuhtelua kohti nykyi-

sin käytössä olevalla superovulaatiokäsittelyohjelmalla. Uudella, kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla nämä lehmät tuottivat keskimäärin  $10,13 \pm 4,67$  ( $\pm$ keskihajonta) siirtokelpoista alkioita huuhtelua kohti. Biancuccin ym. (2016) tutkimuksessa koeryhmän hiehot tuottivat keskimäärin 9,6 siirtokelpoista alkioita huuhtelua kohti kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla, kun taas kontrolliryhmältä saatiin keskimäärin 6,6 siirtokelpoista alkioita huuhtelua kohti kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla. Tässä opinnäytetyössä raportoidun tutkimuksen lehmät tuottivat siirtokelpoisia alkioita keskimäärin paremmin kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla kuin hiehot Biancuccin ym. (2016) tutkimuksessa. Samoin myös nykyisellä superovulaatiokäsittelyllä siirtokelpoisia alkioita tuotettiin tässä opinnäytetyössä raportoidussa tutkimuksessa keskimäärin italialaistutkimusta paremmin. Tulos on itsessään mielenkiintoinen, mutta hiehojen ja lehmien huuhtelutuloksia ei voi kunnolla verrata toisiinsa, koska lehmien kokema lypsyrasitus saattaa vaikuttaa niiden alkiontuottokykyyn.

Molemmilla kierroksilla onnistuneesti alkiohuuhdellut kahdeksan lehmää tuottivat eniten laatuluokaltaan I-luokkaisia alkioita. Nykyisin käytössä olevalla superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotetuista siirtokelpoisista alkioista suurin osa (72,0 prosenttia) oli I-luokkaisia, toiseksi eniten (16,0 prosenttia) II-luokkaisia ja vähiten (12,0 prosenttia) III-luokkaisia. Uudella superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotetuista alkioista jopa 79,0 prosenttia oli I-luokkaisia, 12,3 prosenttia II-luokkaisia ja vain 8,6 prosenttia III-luokkaisia. Tutkimuksessa tuotettiin uudella, kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmalla laatuluokaltaan parempia alkioita kuin nykyisin käytössä olevalla kahdeksan pistoksen käsittelyohjelmalla, joka puoltaa uuden superovulaatiokäsittelyohjelman kykyä tuottaa laadultaan parempia siirtokelpoisia alkioita.

Tutkimuksessa tuotetut siirtokelpoiset alkiot jakautuvat kehitysluokkien 3 (varhainen morula) ja 9 väliin (kuoriutunut blastokysti). Uudella superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotetut alkiot jakautuvat kuitenkin tätä suppeammin luokkien 4 (tiivistynyt morula) ja 9 (kuoriutunut blastokysti) väliin, joka tässä tutkimuksessa viittaa siihen, että kahden pistoksen superovulaatiokäsittely tuottaa tasaisemmin kehittyneitä alkioita. Tutkimuksen alkiohuuhteluissa saatiin kuitenkin lukumääräisesti enemmän nykyisellä superovulaatiokäsittelyohjelmalla tuotettuja siirtokelpoisia alkioita, joka voi vaikuttaa tulokseen siten, että nykyisin käytössä oleva superovulaatiokäsittelyohjelma näyttää tuottavan alkioita uutta superovulaatiokäsittelyohjelmaa paremmin. Myös siirtokelpoisten alkioiden otoskoko ( $n = 203$ ) on niin pieni, että täysin suoria johtopäätöksiä alkioiden laatuluokan tai kehitysasteen eroista ei voida tehdä.

Tuorealkioiden viileäkuljetuksen ja -säilytyksen kestävyttä tutkittiin alkiohuuhteluista saaduilla, siirtokelpoisilla alkioilla. Tämän tutkimuksen tulos osoittaa, että käsittelyliuosten (H+FBS ja H+SR) välillä ei ollut eroa alkioiden viileäkuljetuksen ja -säilytyksen kestävydessä. Siirtokelpoisista tuorealkioista 54,6 prosenttia (107/196) säilytti edelleen kehittymiskyynsä jatkokasvatuksessa vähintään 24 tunnin ajan ja alkiot olivat siten kestäneet vähintään vuorokauden viileäkuljetuksen ja -säilytyksen H+FBS- ja H+SR -liuoksissa. Säilytysliuos ei tämän tutkimuksen perusteella vaikuttanut merkittävästi alkioiden selviytymiseen viileäsäilytyksestä.

Tuloksen perusteella viileäsäilytyksen kestäneistä eli jatkokasvatuksessa eteenpäin kehittyneistä tuorealkioista 70,3 prosenttia (71/101) kuoriutui jatkokasvatuksessa. Tuorealkion kehitysaste tai laatu-luokka ei vaikuttanut olleen merkittävä tekijä alkion viileäkuljetuksen kestävyudessa tai edelleen kehitymiskyvyn säilymisessä. Merkittävä tekijä sen sijaan vaikutti olleen viileäsäilytyksen kesto. Tulosten luotettavuutta heikensi kuitenkin suppea otoskoko. Tuorealkiota säilytettiin +4 asteen lämpötilassa joko yhden, kolmen, viiden tai seitsemän vuorokauden ajan, joka edelleen aiheutti tuloksiin useita muuttujia. Siksi tulosta ei ollut mielekästä tutkia tilastollisin menetelmin, vaan tulokset taulukoitiin. Alkuperäinen suunnitelma oli tutkia vain yhden ja seitsemän vuorokauden viileäsäilytystä, mutta koska hyvin pian selvisi, että alkiot kestivät huonosti seitsemän vuorokauden viileäsäilytyksen, säilytysaikaa lyhennettiin ensin viiteen vuorokauteen ja sitten kolmeen vuorokauteen. Alkioiden säilyvyyteen saattoi vaikuttaa huonontavasti alkioiden seisottaminen huoneenlämpötilassa vaihtelevasti muutamasta tunnista jopa seitsemään tuntiin eli koko sen ajan, kunnes huuhtelupalja ja kaikki petrimaljat oli etsitty läpi, ennen alkioiden pakkaamista olkiin ja siirtoa +4 °C lämpötilaan. Yleinen käsitys on, että säilytys huoneenlämpötilassa neljän tunnin ajan ei vielä huononna alkioiden kykyä tiineyttää vastaanottajia. Lisäksi alkioiden säilyvyyteen saattoi vaikuttaa huonontavasti kuljetuksen jälkeinen jatkosäilytys + 4 asteen jääkaapissa, jossa lämpötila saattoi muuttua oven avaamisen myötä.

## 7 PÄÄTÄNTÖ

Opinnäytetyössä raportoidun tutkimuksen päätavoitteena oli parantaa naudan alkiohuuhtelun superovulaatiokäsittelyä. Nykyisin käytössä olevan, raskaan superovulaatiokäsittelyohjelman kykyä tuottaa alkioita verrattiin kevyempään kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmaan. Näiden käsittelyiden eroja tutkittiin kokeellisessa tutkimuksessa Luonnonvarakeskuksen Maaningan toimipisteen tutkimuspihatossa (Cowlab™). Kokeeseen valituille lehmille tehtiin satunnaisessa järjestyksessä sekä nykyisin käytössä oleva kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma, että kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma, ja alkiosaantoa näiden ohjelmien välillä verrattiin.

Tutkimuksen pienestä otoskoosta huolimatta tavoitteeseen päästiin ja tutkimus tuotti analysoitavia tuloksia. Tämän tutkimuksen tulos on uuden superovulaatiokäsittelyn kannalta lupaava ja se osoittaa, että kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyn lisätutkimukselle on tarvetta. Tutkimuksen suunnitteluvaiheessa toivottiin, ettei kahden ja kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelmien alkiontuottokyky poikkeaisi toisistaan merkittävästi, sillä Biancucci ym. olivat toteuttaneet vastaavan tutkimuksen Italiassa hiehoille saaden siitä kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelman kannalta hyvän tuloksen. Heidän tutkimuksestaan poiketen Maaningan tutkimuspihatossa kyseistä superovulaatiokäsittelyohjelmaa testattiin hiehojen sijasta lypsylehmiin. Tutkimuksessa todettiin, että superovulaatiokäsittelyohjelmien välisessä alkiontuottokyvyssä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa.

Tässä tutkimuksessa huuhdellut siirtokelpoiset alkioit osallistuivat edelleen tuorealkioiden viileäkuljetusta tutkineeseen kokeeseen. Kyseisen tutkimuksen tavoitteena oli kehittää tuorealkioiden viileäkuljetusta. Lisäksi tutkimuksessa selvitettiin, kuinka kauan alkioit kestävät säilytystä +4 asteen lämpötilassa viileäkuljetuksen jälkeen. Nämä tavoitteet saavutettiin, sillä viileäkuljetuksen ja -säilytyksen kestäneiden siirtokelpoisten tuorealkioiden lukumäärä kaikista kuljetetuista alkioista saatiin selville. Viileäkuljetuksen ja -säilytyksen kestäneiden siirtokelpoisten tuorealkioiden lukumäärästä voidaan päätellä, kuinka suuren osan alkioista voidaan olettaa olevan edelleen siirtokelpoisia kuljetuksen ja säilytyksen jälkeen.

Opinnäytetyön tekemiseen toi haastetta superovulaatiokäsittelyohjelmia vertaavan tutkimuksen edessä ilmenneet erilaiset, osittain odottamattomat käänteet. Tutkimusta toteutettiin usean kuukauden ajan, jolloin on ymmärrettävää, että eläville eläimille voi tapahtua jotain sellaista, mikä vaikuttaa myös tutkimuksen kulkuun ja lopulliseen tulokseen. Toinen haastava tekijä opinnäytetyön kirjoittamisessa oli suppea suomenkielinen lähdeaineisto. Kaupallisesti alkionsiirtoja ja -huuhteluita toteuttavilla yrityksillä on olemassa omat toimintamallinsa ja ohjeet esimerkiksi alkioiden käsittelyyn liittyen, mutta virallista, yleispätevää kirjallisuutta etenkin Suomessa käytetyistä menetelmistä ei ole lähes lainkaan ja aineisto on hajanaista.

Tutkimuksen toteuttamiseksi tehtiin paljon töitä ja aikaa kului paljon, osittain jopa suunniteltua enemmän. Jo ennen tutkimuksen aloittamista kokeeseen valittujen lehmien munasarjojen toimintaa

seurattiin tarkasti ultraäänitutkimuksilla. Tutkimuksen aikana lehmät reagoivat kukin omalla tavallaan kiimojen yhdenaikaistamiseen ja superovulaatiokäsittelyyn ja siksi esimerkiksi kahdelle lehmälle jouduttiin toistamaan sama superovulaatiokäsittelyohjelma alusta uudelleen, mikä edelleen lisäsi työmäärää. Lehmien munasarjojen tarkka seuraaminen ultraäänitutkimuksilla tutkimuksen edetessä oli välttämätöntä kokeen onnistumisen kannalta.

Selkeästi tuli esille se, että kiimojen yhdenaikaistaminen huuhtelukierrosten välillä emätinkierukoilla ei sopinut kahden pistoksen superovulaatiokäsittelylle. Italiassa hiehotutkimuksessa huuhtelukierrosten välillä oli kahden kuukauden tauko. Lehmien kohdalla kahden alkiohuuhtelukierroksen läpivienti minimiajassa kahden kuukauden aikana oli erittäin kunnianhimoinen tavoite, eikä se toteutunut ryhmän A kohdalla. Varsinaisesti vain yksi (Lehmä A) ryhmän A kuudesta lehmästä selvitti yhdistelmän kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittely – kiiman yhdenaikaistaminen emätinkierukalla – kahden pistoksen superovulaatiokäsittely ohjelmassa suunnitellussa aikataulussa. Kolme muuta lehmää (F, G ja L) putosivat omasta neljän lehmän ryhmästään, mutta saatiin huuhdeltua pidemmällä aikavälillä kuin oli suunniteltu. Ja kaksi lehmää (B ja I) jäi kokonaan huuhtelematta toisen kerran. Ryhmässä B vastaavasti neljä lehmää (C, E, J ja K) kuudesta huuhdeltiin kahdesti suunnitellussa aikataulussa. Loput kaksi ryhmän B lehmää (D ja H) putosivat omasta neljän lehmän ryhmästään, mutta saatiin huuhdeltua toisen kerran pidemmällä aikavälillä kuin oli suunniteltu. Jatkotutkimuksissa huuhtelukierrosten välillä on hyvä pitää pidempi tauko.

Tuorealkioiden viileäkuljetuksen ja -säilytyksen kestävyyttä tutkineen kokeen toteutuksen aikana piti muuttaa suunnitelmaa, koska heti ensimmäisten 7 vuorokauden säilytyksessä olleiden alkioiden jälkeen voitiin todeta, että 7 vuorokauden säilytys oli liian pitkä ja säilytysaikaa lyhennettiin ensin viiteen ja sitten kolmeen vuorokauteen. Tämän vuoksi tuloksissa oli useita muuttujia, mikä hankaloitti tulosten tulkitsemista. Eri tavalla käsiteltyjen alkioiden lukumäärät saattoivat jäädä niin pieniksi, ettei tulosta voida suoraan yleistää pienen otoksen vuoksi.

Nykyisin käytössä oleva kahdeksan pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelma on ollut käytössä siitä lähtien, kun alkionsiirto kaupallistui. Se on usean pistoskerran ansiosta raskas eläimelle ja vaatii sekä aikaa että tarkkuutta hoitajalta. Korvaavia superovulaatiokäsittelyjä on kyllä tutkittu, mutta toistaiseksi mikään niistä ei ole vakiinnuttanut asemaansa. Mikäli superovulaatiokäsittelyä voitaisiin helpottaa, samoin kuin alkioiden kuljetusta vastaanottajaeläinten luo, se voisi lisätä tilallisten kiinnostusta alkionsiirtoa kohtaan. Alkionsiirto on nopea ja resurssitehokas tapa parantaa karjan jalostuksellisia ominaisuuksia.

Opinnäytetyössä pyrittiin käyttämään mahdollisimman luotettavia lähteitä, jotta työ olisi luotettava. Luotettaviksi lähteiksi arvioitiin sellaiset tekstit ja tiedostot, joiden kirjoittaja tai julkaisija oli mainittu. Myös lähteiden ajantasaisuuteen kiinnitettiin huomiota. Lähteitä käytettiin laajasti, jotta työstä tuli kattava. Opinnäytetyö on pyritty myös kirjoittamaan asiantuntevasti ja sisällöltään selkeästi, jotta se on uskottava.

Työllä on merkitystä sekä toimeksiantajalle että yhteistyökumppaneille. Opinnäytetyön tulokset osoittavat, että lisätutkimukselle on tarvetta, ja että nykyisiä käytäntöjä on todennäköisesti mahdollista kehittää juuri tutkimusten osoittamaan suuntaan. Opinnäytetyön toimeksiantaja saa tästä työstä kattavan paketin tutkimuksen toteutuksesta ja tuloksista, jota voidaan hyödyntää esimerkiksi tutkimuksesta julkaistavissa artikkeleissa tai lisätutkimuksen tarvetta perusteltaessa.

Opinnäytetyön kirjoittaminen näistä tutkimuksista tuntui mielenkiintoiselle, sillä osallistuin superovulaatiokäsittelyitä tutkivan kokeen käytännöntoteutukseen alusta saakka. Superovulaatiokäsittelyn kehittäminen olisi mielestäni tärkeää, sillä kahden pistoksen hormonikäsittely vähentäisi eläimen tuntemaa epämukavuutta ja lisäksi ihmistyön määrä vähenisi harvempien pistoskertojen myötä. Mikäli alkioiden viileäkuljetuksen kestävydestä saataisiin tutkimusnäyttöä, viileäkuljetuksia voitaisiin edelleen lisätä alkionsiirtojen yhteydessä. Viileäkuljetuslaatikon kuljettaminen esimerkiksi julkisten liikennevälineiden mukana on mahdollista, toisin kuin typpisäiliöiden, ja se helpottaisi alkioiden kuljetusta sekä alentaisi kuljetuksesta aiheutuvia kustannuksia.

Tulevaisuudessa kahden pistoksen superovulaatiokäsittelyohjelman tutkimusta voisi jatkaa esimerkiksi suuremmalla otoskoollla ja pidemmällä aikavälillä huuhtelukierrosten välillä. Siten käsittelyn mahdolliset haittavaikutukset voitaisiin selkeämmin havaita. Tuorealkioiden viileäkuljetusta ja säilytystä tutkittaessa puolestaan kävi ilmi, etteivät alkiot kestäneet seitsemän vuorokauden mittaista viileäsäilytystä, mutta viiden vuorokauden pituinen viileäsäilytys saattaisi olla mahdollinen. Yhdestä vuorokaudesta viiteen vuorokauteen kestävää tuorealkioiden viileäsäilytystä voisi tulevaisuudessa tutkia tarkemmin.

Tutkimuksen toteuttaminen oli vastaavalle tutkijalle Heli Lindebergille työläs projekti, sillä pyrkimyksenä oli tehdä tutkimus mahdollisimman huolellisesti. Hänelle haluan esittää erityisen kiitoksen paneutumisesta opinnäytetyöprosessiini. Myös tutkimuksen toteutuksessa avustaneiden henkilöiden, joihin itse kuuluin, työpanos oli huomattava. Opinnäytetyön kirjoittamisprosessissa pyrin käyttämään kattavasti lähteitä. Kokonaisuudessaan tämä työ kokoaa hyvin naudan alkiohuuhtelun nykyisiä käytänteitä ja tuo esille ajankohtaiset kehittämismahdollisuudet alkionsiirron rintamalla.

## LÄHTEET JA TUOTETUT AINEISTOT

- AETE 2016. 32nd Scientific Meeting [verkkojulkaisu]. AETE. [Viitattu 2017-04-17.] Saatavissa: <http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/140-aete-proceedings-2016/file>
- ALASUUTARI, Sakari, MANNI, Katariina ja RAUTALA, Helena 2010. Lypsylehmän ruokinta ja hoito. 3. tarkistettu painos. Helsinki: Opetushallitus.
- ARO, Johanna, HILPELÄ-LALLUKKA, Ritva, NIEMI, Anne-Mari, TOIVONEN, Minna ja VAHLSTEN, Terhi 2012. Mittaa ja valitse. 2. uudistettu painos. Helsinki: Opetushallitus.
- BAYER s.a. Farm Advisor: Schematic representation of bovine follicular dynamics in cows with two- or three-wave cycles and corresponding surges of FSH [verkkoaineisto]. [Viitattu 2017-04-17.] Saatavissa: <http://www.farmadvisor.com.au/parasites-pests-control/view/?dn=9>
- BIANCUCCI, Andrea, SBARAGLI, Tatiana, COMIN, Antonella, SYLLA, Lakamy, MONACI, Maurizio, PERIC, Tanja ja STRADAIOLI, Giuseppe 2016. Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? Theriogenology [digilehti] 86, 914–921. [Viitattu 2017-01-10.] Saatavissa: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(15\)00606-8/fulltext](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(15)00606-8/fulltext)
- BÓ, G. A. ja MAPLETOFT, R. J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. Animal Reproduction Science [digilehti] 10, 344–348. [Viitattu 2017-02-24.] Saatavissa: <http://cabra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p344-348%20%28AR628%29.pdf>
- ELINTARVIKETURVALLISUUSVIRASTO 2016a. Luomutuotanto 2, Eläintuotannon ehdot [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-03-21.] Saatavissa: [https://www.evira.fi/globalassets/yhteiset/luomu/luomutuotannon-ohjeet/luomutuotanto-2-versio-9-elaintuotannon-ehdot\\_fi.pdf](https://www.evira.fi/globalassets/yhteiset/luomu/luomutuotannon-ohjeet/luomutuotanto-2-versio-9-elaintuotannon-ehdot_fi.pdf)
- ELINTARVIKETURVALLISUUSVIRASTO 2016b. Nautojen alkionkeräys- ja/tai alkiontuotantoryhmät [verkkojulkaisu]. [Viitattu 2017-01-24.] Saatavissa: <https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/tuonti-ja-vienti/eu-hyvaksytyt-laitokset/20160217-hyvaksytyt-nautojen-alkionkerays--ja-tuotantoryhmat.pdf>
- ELÄINTAUTILAKI L 2013/441. Finlex. Lainsäädäntö. [Viitattu 2017-03-03.] Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20130441>
- FABA 2017. Alkiot [verkkojulkaisu]. Faba osuuskunta. [Viitattu 2017-02-24.] Saatavissa: <http://www.faba.fi/fi/tietopankki/alkiot>
- FAO s.a. Schematic representation of the changes in plasma hormone concentrations during the bovine oestrous cycle [verkkoaineisto]. FAO. [Viitattu 2017-02-22.] Saatavissa: <http://www.fao.org/Wairdocs/ILRI/x5442E/x5442e04.htm>
- FIMEA s.a. Kliiniset eläinlääketutkimukset. Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskuksen Fimean sivusto. [Viitattu 2017-04-02.] Saatavissa: [http://www.fimea.fi/elainlaakkeet/kliiniset\\_elainlaaketutkimukset](http://www.fimea.fi/elainlaakkeet/kliiniset_elainlaaketutkimukset)
- GIVENS, M. Daniel, GARD, Julie A. ja STRINGFELLOW, David A. 2007. Relative risks and approaches to biosecurity in the use of embryo technologies in livestock. Theriogenology [digilehti] 68, 298–307. [Viitattu 2017-04-17.] Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0700132X>
- HEIKKILÄ, Laura 2015. Naudan alkionsiirto. Helsingin Yliopisto. Eläinlääketieteellinen tiedekunta. Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma. Saatavissa: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/157077/Lisensiaatin%20tutkielma%20Heikkil%C3%A4.pdf?sequence=1>
- HEIKKILÄ, Tarja 2014. Tilastollinen tutkimus. 9. uudistettu painos. Helsinki: Edita.

- HULSEN, Jan 2011 (2010). Hedelmällisyys. (Suom. Maria Tirkkonen.) Vantaa: ProAgria Keskusten Liitto.
- IETS 2016. 2015 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals [verkkoaineisto]. IETS Data Retrieval Committee. [Viitattu 2017-02-27.] Saatavissa: [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_2015\\_V2.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_2015_V2.pdf)
- JUGA, Jarmo, MAIJALA, Kalle, MÄKI-TANILA, Asko, MÄNTYSAARI, Esa, OJALA, Matti ja SYVÄJÄRVI, Jouko 1999. Kotieläinjalostus. Vantaa: Suomen kotieläinjalostusosuuskunta.
- KUKKONEN, Sara 2017-08-22. Epiduraalipuudutuksen vaiheet [digikuva]. Sijainti: Iisalmi: Tekijän sähköiset kokoelmat.
- LINDEBERG, Heli s.a. Hitaasti follikkelia stimuloivaa hormonia (FSH) vapauttavan kantaja-aineen käyttö naudan alkiohuuhtelun superovulaatiokäsittelyssä [julkaisematon tutkimussuunnitelma]. Luonnonvarakeskus.
- LINDEBERG, Heli 2017-03-08. Vanhempi tutkija. Kokous opinnäytetyöstä. [Henkilökohtainen tiedonanto.] Maaninka: Luonnonvarakeskus.
- LINDEBERG, Heli 2015. OPU-IVP keinollisen lisääntymistekniikan soveltaminen tilaoloihin Pohjois-Savon lypsykarjatiloiilla [verkkajulkaisu]. Helsinki: Luonnonvarakeskus (Luke). [Viitattu 2017-03-15.] Saatavissa: [http://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/486066/luke-luobio\\_23\\_2015.pdf?sequence=4](http://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/486066/luke-luobio_23_2015.pdf?sequence=4)
- LÄÄKELAKI L 16.10.2009/773. Finlex. Lainsäädäntö. [Viitattu 2017-04-17.] Saatavissa: <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1987/19870395#L10P88a>
- MAPLETOFT, R. J. 2006. Bovine Embryo Transfer. IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S. International Veterinary Information [verkkoaineisto]. IVIS. [Viitattu: 2017-01-07.] Saatavissa: [http://www.uesc.br/cursos/pos\\_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2008/mapletoft\\_2006.pdf](http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2008/mapletoft_2006.pdf)
- MAPLETOFT, R.J. 2013. History and perspectives on bovine embryo transfer. Animal Reproduction Science [digilehti] 10, 168–173. [Viitattu 2017-02-27]. Saatavissa: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p168-173%20%28AR612%29.pdf>
- MAPLETOFT, Reuben, STEWARD, Kristina ja ADAMS, Gregg 2002. Recent advances in the superovulation in cattle [verkkoaineisto]. HAL. [Viitattu 2017-04-17.] Saatavissa: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00900425/document>
- MONNIAUX, Danielle, BARBEY, Sarah, RICO, Charlene, FABRE, Stéphane, GALLARD, Yves ja LARROQUE, Hélène 2010. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? Reproduction, Fertility and Development [digilehti] 22, 1083–1091. [Viitattu 2017-03-03.] Saatavissa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797346>
- NOKKA, Sanna 2016. Lypsykarjan tuotosseurannan tulokset 2015. ProAgria Keskusten Liiton sivusto. [Viitattu: 2017-01-09.] Saatavissa: [https://www.proagria.fi/sites/default/files/attachment/lypsykarjan\\_tuotosseurannan\\_tulokset\\_2015.pdf](https://www.proagria.fi/sites/default/files/attachment/lypsykarjan_tuotosseurannan_tulokset_2015.pdf)
- RANTA, Esa, RITA, Hannu ja KOUKI, Jari 2012. Biometria: Tilastotiedettä ekologeille. 10. painos. Helsinki: Gaudeamus.
- RANTA, Sini 2012. Nautojen toimilupasiemennys. Hämeen ammattikorkeakoulu. Maaseutuelinkeinojen koulutusohjelma. Opinnäytetyö. [Viitattu 2017-04-17.] Saatavissa: [https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/40983/Ranta\\_Sini-2.pdf?sequence=1](https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/40983/Ranta_Sini-2.pdf?sequence=1)
- RAUTALA, Helena 1996. Tavoitteena terve karja. 3. painos. Vantaa: Suomen kotieläinjalostusyhdistys.
- RIIHIKOSKI, Urho 1991. Kotieläinten rakenne ja terveydenhuolto. 1. uudistettu painos. Helsinki: Kirjayhtymä.



- SELK, Glenn s.a. Embryo Transfer in Cattle [verkkoaineisto]. Oklahoma: Oklahoma State University. [Viitattu 2017-02-27.] Saatavissa: [http://www.thejudgingconnection.com/pdfs/Embryo\\_Transfer.pdf](http://www.thejudgingconnection.com/pdfs/Embryo_Transfer.pdf)
- SIRKKOLA, Heikki ja TAURIAINEN, Susanna (toim.) 2013. Eläinten lääkintä ja hoito - käsikirja eläintenhoitajille. 3. tarkistettu painos. Helsinki: Opetushallitus.
- SÄYNÄJÄRVI, Mikko 2017-04-05. Tuorealkioiden pakkaaminen viileäkuljetuslaatikkoon [digikuva]. Sijainti: Hollola: Tekijän sähköiset kokoelmat.
- TAANILA, Aki 2014. Määrällisen aineiston kerääminen [verkkajulkaisu]. Haaga-helia ammattikorkeakoulu. [Viitattu: 2017-03-21.] Saatavissa: <http://myy.haaga-helia.fi/~taaak/t/suunnittelu.pdf>
- TAURÉN, Pirkko 28-11-2016. Alkionsiirrot Suomessa [henkilökohtainen tiedonanto]. Saatavissa: Iisalmi: SK:n kokoelmat.
- TROXEL, Tom R. s.a. Embryo Transfer in Cattle [verkkoaineisto]. University of Arkansas System. [Viitattu 2017-03-03.] Saatavissa: <https://www.uaex.edu/publications/PDF/FSA-3119.pdf>
- VARTIA, Kirsi s.a. Alkiohuuhtelun järjestäminen tilalla [verkkajulkaisu]. Faba. [Viitattu 2017-03-04.] Saatavissa: [http://www.faba.fi/sites/default/files/common/vartia\\_alkiohuuhtelun\\_jarj\\_tilalla\\_jalostuskurssi\\_2015.pdf](http://www.faba.fi/sites/default/files/common/vartia_alkiohuuhtelun_jarj_tilalla_jalostuskurssi_2015.pdf)

LIITE 1. Tyhjä alkiohuuhtelukaavake

**Tila:** **HUUHTELUOHJELMA**

<b>HUUHDELTAVA LEHMÄ:</b>			
<b>PVM</b>	<b>UÄ-TUTKIMUS</b>		
	vasen munasarja:		
	oikea munasarja:		

**ALOITUSKIIMAN PVM:**

<b>HUUHDELTAVA LEHMÄ:</b>			<b>HORMONIN ANTA- JAN</b>
<b>PVM</b>	<b>LÄÄKITYS JA ANNOS</b>	<b>KLO</b>	<b>KUITTAUS</b>

**HUUHDELTAVAN ELÄIMEN KIIMANTARKKAILU:**SEISOVAN KIIMAN AJANKOHTA:  
SIEMENNYS ALOITETAAN 12 H SEISOVASTA KIIMASTA

<b>PVM</b>	<b>TOIMENPIDE</b>	<b>KLO</b>	<b>KOMMENTTEJA</b>
	1. SIEMENNYS		
	2. SIEMENNYS		
	3. SIEMENNYS		

**HUUHTELUN PVM:**



## LIITE 3. Tutkimuksen alkiohuuhteluissa käytetyt tarvikkeet

- Y-letku
- Suodatin
- Huuhtelukatetri (Ch20)
- Huuhtelukatetrin jäykistin
- Huuhtelunestepussi 1 l Vigro (2 kpl/huuhtelu)
- Pyyhkimislappuja
- Tuffereita eli puhtaita, hygieenisiä lappuja katetrin jäykistimen liukastamiseen
- Sakset
- 70 % denaturoitu etanoli puhdistukseen
- Bovivet-geeli
- Jäykistimenliukastusgeeli
- 20 millilitran ruisku
- 5 millilitran ruisku puudutus- ja rauhoitusaineelle
- Procamidor-puudute epiduraalipuudutukseen
- Xysol-rauhoitusaine, käytettäväksi tarvittaessa eläimen rauhoittamiseen
- Veitsen terä epiduraalipuudutuksen pistokohdan ajeluun
- 21 G:n neuloja
- 18 G:n neuloja
- Huuhtelukäsine
- Pitkä tutkimuskäsine
- Narua ja ilmastointiteippiä hännän sitomiseen sekä pussin ripustamiseen
- Tuoli avustajaa varten
- Puhdas ämpäri (jossa lämmintä, noin 40 asteista vettä)
- Muistiinpanovälineet
- Ilmanpoistopumppu